

INSULINDEGRADATION UND
INSULINREZEPTORBINDUNG VON
ERYTHROCYTEN BEI TYP 2
DIABETIKERN

Rudolf Standl

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der III. Medizinischen Abteilung des Städtischen
Akademischen Lehrkrankenhauses München-Schwabing

Direktor: Professor Dr. H. Mehnert
und der Forschergruppe Diabetes München
Leiter: Professor Dr. H. Mehnert

INSULINDEGRADATION UND INSULINREZEPTORBINDUNG VON
ERYTHROCYTEN BEI TYP 2 DIABETIKERN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Standl

aus
Seeshaupt

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. H.-U. Janka

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. H. Mehnert

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1986

Meinen Eltern

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Mehnert für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an der III. Medizinischen Klinik des Krankenhauses München-Schwabing.

Sehr herzlich danke ich Herrn Privatdozenten Dr. H.-U. Janka für die Überlassung des Themas und die wertvolle Betreuung.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. H.J. Kolb und Herrn Professor Dr. L. Weiss sowie den Mitarbeitern des Klinisch-chemischen Institutes am Krankenhaus Harlaching für die gute Betreuung und Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich meinem Bruder Professor Dr. E. Standl danken für sein besonderes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Jederzeit stand auch er mir mit Rat und Tat zur Seite.

Schließlich danke ich Herrn Tomulla für das Anfertigen der Zeichnungen.

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	Seite	1
II	PATIENTEN	Seite	3
III	METHODEN	Seite	6
	1. Blutabnahme und -verarbeitung	Seite	6
	2. Bestimmung der spezifischen Insulinase- aktivität in Erythrocyten	Seite	9
	a) Herstellung des Hämolysates	Seite	9
	b) Testansatz und Bestandteile	Seite	9
	c) Testablauf	Seite	11
	d) Hämoglobinbestimmung	Seite	11
	e) Auswertung	Seite	12
	3. Bestimmung der spezifischen Bindung von Insulin an Erythrocyten	Seite	14
	a) Vorbereitung der Erythrocyten	Seite	14
	b) Inkubation	Seite	15
	c) Isolierung der Erythrocyten	Seite	17
	d) Auswertung	Seite	18
	e) Reticulocytenzählung	Seite	19
	4. Radioimmunologische Bestimmung von Insulin	Seite	21
	a) Vorbereitung der Standards und Proben	Seite	21
	b) Durchführung der Insulinbestimmung	Seite	22
	c) Auswertung	Seite	22

5. Semiquantitative Bestimmung von insulin-		
bindenden Antikörpern im Plasma	Seite	23
a) Vorbereitung der Proben und des Insulins	Seite	23
b) Inkubation und Sulfatfällung	Seite	23
c) Auswertung	Seite	24
6. Weitere Bestimmungsverfahren	Seite	25
a) Hämoglobin A ₁	Seite	25
b) Cholesterin im Plasma	Seite	26
c) Triglyceride im Plasma	Seite	28
d) Glukose im Kapillarblut	Seite	29
7. Statistische Auswertung	Seite	32
IV ERGEBNISSE	Seite	33
1. Insulinaseaktivität in Erythrocyten	Seite	33
2. Insulinbindung an Erythrocyten	Seite	34
3. Insulinspiegel im Plasma	Seite	39
4. Korrelationen	Seite	40
V DISKUSSION	Seite	42
1. Zur Pathophysiologie bei Typ 2 Diabetes	Seite	42
2. Zur Untersuchung der Insulinaseaktivität	Seite	45
3. Zur Untersuchung der Insulinbindung	Seite	51
VI ZUSAMMENFASSUNG	Seite	55
VII LITERATURVERZEICHNIS	Seite	58
VIII LEBENSLAUF	Seite	72

I. EINLEITUNG

Über die Vorgänge sowie die physiologische Bedeutung der Inaktivierung beziehungsweise des Abbaus von Insulin bestehen heute noch keine exakten Vorstellungen. Ein Enzym, das Insulin auf proteolytischem Wege rasch abbaut, wurde sowohl in vielen tierischen (13, 14, 15, 16, 22, 24, 29, 50, 74, 79 u. 106) als auch einigen menschlichen Geweben (5, 7, 52, 53, 56, 63, 66, 71 u. 75) gefunden. Dieses Enzym war im Zytosol der entsprechenden Zellen gelöst. Daneben kennt man die reduzierende Spaltung der Disulfidbrücken, die die A- und B-Kette des Insulins verbinden, mittels einer Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (1, 66, 74 u. 98). Eine Reihe von Berichten spricht dafür, daß sowohl die Insulinwirkung als auch die Insulindegradation vermittelt werden, indem - gewissermaßen als auslösendes Moment - Insulin an spezifische Rezeptoren der Zellmembran gebunden wird (5, 7, 36, 71, 75 u. 92). Eine präzisere Aussage läßt sich dazu allerdings noch nicht machen.

Bei Streptozotocin-diabetischen Ratten wurde ein vermehrter Abbau von Insulin im Muskelgewebe beobachtet. Durch Behandlung mit Insulin konnte dieser gesteigerte Abbau wieder normalisiert werden (21). Außerdem lassen Untersuchungen bei einigen Patienten mit sehr ausgeprägter Insulinresistenz vermuten, daß ein beschleunigter Insulinabbau auf der Ebene der Zielgewebe die Ursache für den exzessiv hohen Insulinbedarf sein könnte (51, 58, 60, 62, 64 u. 70).

In der vorliegenden Untersuchung sollte nun mehr allgemeinen Fragen zum Insulinabbau bei Diabetes mellitus nachgegangen werden. Speziell beim Diabetes mellitus vom Typ 2 ist in den letzten Jahren ein kombinierter Defekt im Rezeptor- und Postrezeptorbereich als pathogenetischer Faktor der peripheren Insulinresistenz diskutiert worden (11, 54, 76, 80 u. 89). Der Aspekt der Insulindegradation ist dabei aber bisher praktisch nicht bearbeitet worden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität eines In-

sulin-abbauenden Enzyms, einer Protease, und die Insulinbindung der Erythrocyten in Relation zur freien Insulinkonzentration im Plasma bei verschiedenen Gruppen von Typ 2 Diabetikern sowie einer Kontrollgruppe bestimmt. Diese Protease ist bereits gereinigt dargestellt worden (52 u. 53), wobei gezeigt werden konnte, daß sie ähnliche Eigenschaften wie ein entsprechendes, ebenfalls gereinigtes Enzym aus dem menschlichen Skelettmuskel hat (66).

II. PATIENTEN

Untersucht wurden insgesamt 52 Personen, 24 männliche und 28 weibliche, verteilt auf fünf Gruppen. Tabelle 1 gibt Auskunft über klinische Charakteristika der einzelnen Gruppen.

Das Normalkollektiv (Gruppe 1) umfaßte 16 gesunde Personen (elf männliche und fünf weibliche). Das durchschnittliche Alter dieser Gruppe betrug 31 Jahre, der jüngste Proband war 22, der älteste 66 Jahre. Das Gewicht der Normalpersonen lag im Durchschnitt etwa zwei Prozent über dem Sollgewicht, berechnet nach der Formel: Sollgewicht = Körpergröße in Zentimeter minus 100, bei Frauen vermindert um 15 %, bei Männern vermindert um 10 % (39).

Die übrigen Gruppen bestanden aus 36 Patienten mit manifestem Typ 2 oder Erwachsenen-Diabetes, 13 Männer und 23 Frauen. Das durchschnittliche Alter betrug 68 Jahre. Die einzelnen Patienten waren zwischen 16 und 80 Jahren alt. Die jüngste Patientin hatte vermutlich einen sogenannten Erwachsenendiabetes beim Jugendlichen = MODY-Diabetes (Maturity-Onset Diabetes in the Young). Das Gewicht der Diabetiker insgesamt lag durchschnittlich 29 % über dem Sollgewicht.

Im einzelnen verteilten sich die Diabetiker auf folgende Gruppen: 14 Patienten, die mit entsprechender Diät und Sulfonylharnstoffen gut eingestellt waren (Gruppe 2); 9 Patienten, die trotz Diät und Sulfonylharnstoffen eine schlechte Stoffwechselsituation aufwiesen, sogenannte Sekundärversager der oralen Diabetestherapie (Gruppe 3); 8 Patienten mit guter Stoffwechselsituation nach einwöchiger Behandlung mit Insulin (Gruppe 4; diese Gruppe rekrutierte sich aus der Gruppe der Sekundärversager (Gruppe 3), die bis auf einen Patienten also zweimal untersucht wurde; siehe Punkt III 7.). 5 Patienten mit einem täglichen Insulinbedarf von mehr als 80 Einheiten zur Aufrechterhaltung einer ausreichend guten Stoffwechselsituation, was durch mindestens einwöchige stationäre Beobachtung gesichert wurde (Gruppe 5). In diese letzte Gruppe wurden

nur Patienten aufgenommen, die keine signifikanten Titer von Antikörpern gegen Insulin im Plasma hatten.

Einschließlich der Kontrollgruppe bestand bei keinem der Patienten ein Hinweis auf eine signifikante Leber-, Nieren- oder Infektionskrankheit. Abgesehen von der gleichzeitigen Behandlung einer geringen Herzinsuffizienz oder eines Hypertonus wurden von keiner der Personen irgendwelche Pharmaka eingenommen. Alle hatten ein normales Blutbild einschließlich normaler Retikulozytenzahlen. Bei jedem Patienten wurde eine Anamnese erhoben, die besonders ausgerichtet war auf den Diabetes mellitus, seinen Typ, seine Dauer, die aktuelle Behandlung sowie frühere Behandlungen. Nach Begleiterscheinungen und Folgekrankheiten des Diabetes wurde gezielt gefragt wie auch nach etwaigen sonstigen Erkrankungen und Leiden. Ebenso wurde Alter, Körpergröße und Gewicht bestimmt und festgehalten. Die Stoffwechselsituation wurde beurteilt anhand der HbA_{1c}-Werte im Blut sowie der letzten gemessenen Blut- und Harnzuckerwerte und des Acetongehaltes im Urin. Dabei wurden postprandiale Glucosekonzentrationen im Kapillarblut, die unter 200 mg/100 ml lagen, als Kriterium für eine noch ausreichend gute Einstellung gewertet. Werte, die deutlich über 200 mg/100 ml lagen, galten als Kriterium für eine unbefriedigende, schlechte Stoffwechselsituation. Auch bei den nichtdiabetischen Personen der Kontrollgruppe wurden postprandiale Blutzuckerbestimmungen am Untersuchungstag durchgeführt.

Die venöse Blutabnahme erfolgte stets am Morgen gegen 8.00 Uhr, nüchtern und vor Verabreichung von Insulin oder Sulfonylharnstoffen. Die Entnahme von Kapillarblut erfolgte eine Stunde postprandial. Alle Personen, die an der Studie teilnahmen, waren über das Vorgehen informiert und hatten ihr Einverständnis erklärt. Ebenso wurde das Einverständnis des örtlichen ethischen Komitees eingeholt.

Tabelle 1 Übersicht und klinische Charakterisierung der untersuchten Gruppen; Angaben sind Durchschnittswerte $\pm$ SEM

Gruppe:	I	II	III	IV		V
	Normal- personen (n=16)	Typ 2- Diabetes oral gut eingest. (n=14)	Typ 2- Diabetes oral schlecht (n=9)	Sekundärversager 1.Unt. 2.Unt. vor nach Umstellung auf In- sulin (n=8)		Insulinbe- darf über 80 IE pro Tag (n=5)
Alter (Jahre)	31 $\pm$ 3	66 $\pm$ 5	70 $\pm$ 2	71 $\pm$ 2	71 $\pm$ 2	68 $\pm$ 5
Körpergewicht (% vom Vollgewicht)	102 $\pm$ 4	135 $\pm$ 5	129 $\pm$ 7	130 $\pm$ 7	129 $\pm$ 7	113 $\pm$ 7
Diabetesdauer (Jahre)		6 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3
Glukose (mg/100 ml)	90 $\pm$ 3	154 $\pm$ 10	282 $\pm$ 20	285 $\pm$ 23	159 $\pm$ 19	147 $\pm$ 20
Hämoglobin A _{1c} (%)	7,1 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,2	14,9 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,5	10,9 $\pm$ 0,7
Diabetes bei Sulfo- nylharnstoffen oder Insulin pro Tag (Tbl. bzw. IE)		2,0 $\pm$ 0,3 Tbl.	3,3 $\pm$ 0,4 Tbl.	3,2 $\pm$ 0,3 Tbl.	33 $\pm$ 5 IE	90 $\pm$ 8 IE
Triglyceride im Plasma (mg/100 ml)	78 $\pm$ 11	173 $\pm$ 16	230 $\pm$ 42	209 $\pm$ 40	155 $\pm$ 42	244 $\pm$ 39
Cholesterin im Plasma (mg/100 ml)	201 $\pm$ 10	200 $\pm$ 11	243 $\pm$ 17	231 $\pm$ 13	209 $\pm$ 12	223 $\pm$ 19
Freies Insulin im Plasma, nüch- tern (μ E/ml)	9,6 $\pm$ 1,3	17,9 $\pm$ 2,2	16,4 $\pm$ 3,1	17,6 $\pm$ 3,2	17,4 $\pm$ 3,0	33,9 $\pm$ 8,3

III. METHODEN

1. Blutabnahme und -verarbeitung

Nach der Erhebung der ausführlichen Anamnese erfolgte die Blutabnahme aus der Vena mediana cubiti mittels Venenpunktion. Alle Patienten waren vorher über den Zweck der Untersuchung und über die Freiwilligkeit ihrer Teilnahme unterrichtet worden. Für die diversen Bestimmungen reichten 20 ml Vollblut aus.

Da sowohl für die Bestimmung der Insulinabbaurate als auch der Insulinbindung an rote Blutkörperchen Erythrocyten erforderlich waren, wurde das Blut sofort nach der Entnahme mit Heparin ungerinnbar gemacht, wie bei (4, 30, 31 u. 83) angegeben. Dazu wurden Venoject Vakuumröhrchen mit 150 U.S.P.-Einheiten von Natriumheparinat - für 10 ml Vollblut benutzt (Terumo, Frankfurt/Main).

Zur Bestimmung des Blutzuckers wurde Kapillarblut aus einer Fingerbeere entnommen. Dabei wurde mit einer Glaskapillare 0,1 ml Blut in 1,0 ml 3 %ige Perchlorsäure pipettiert.

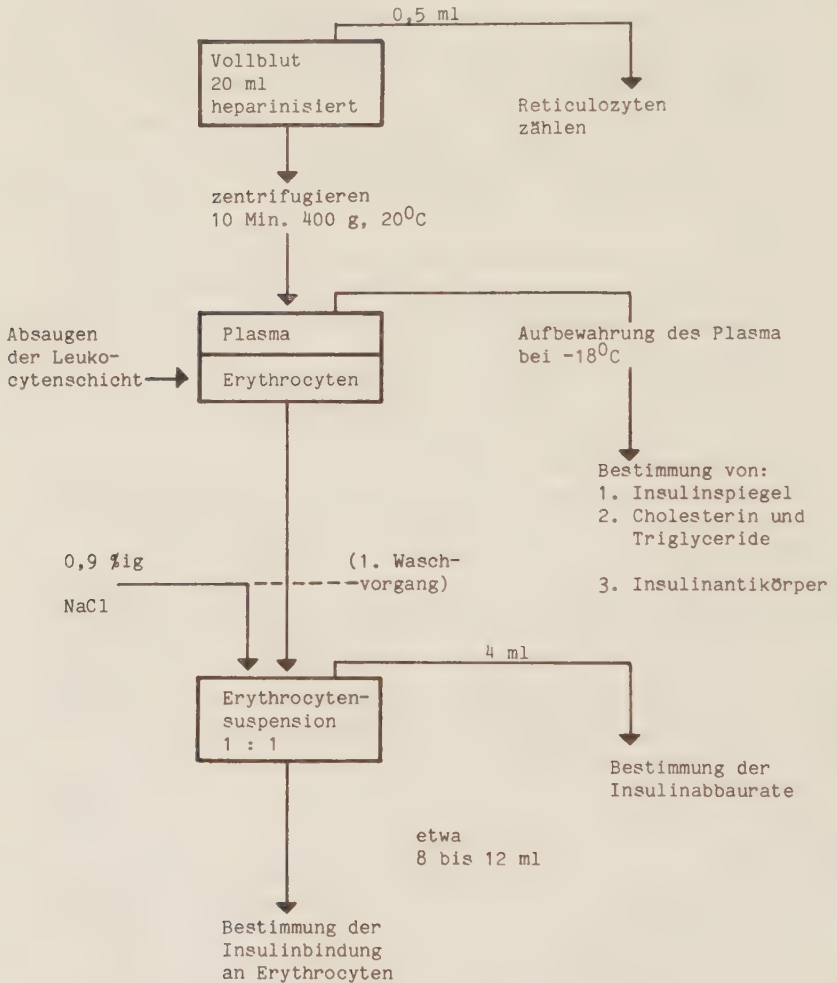
Die so gewonnenen Proben wurden eiskühlt ins Labor gebracht. Dort wurden 0,5 ml Vollblut abpipettiert und darin der Anteil der Retikuloeyten an den Erythrocyten bestimmt. Das übrige Blut wurde 10 Minuten mit 400 g bei 20°C zentrifugiert, entsprechend der Methode von Gambhir et al. (30 u. 31). Das überstehende Plasma wurde in 2,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -18 bis -20°C tiefgefroren. Daraus wurden dann folgende Plasmawerte bestimmt:

1. Insulinspiegel mittels Radioimmunbesteck
2. Gesamtcholesterin und Triglyceride
3. Antikörper gegen Insulin

Die Erythrocyten wurden sorgfältig vom restlichen Plasma sowie von der grauen Schicht der Leukocyten mittels Wasserstrahlpumpe und Absaugpipette gereinigt. Es folgte ein erster Waschvorgang mit

isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1. Zur Bestimmung der Insulinaseaktivität wurden 4 ml der entstandenen Suspension in ein neues Röhrchen pipettiert. Der Rest, je nach Erythrocytenzahl und Hämatokrit 8 bis 12 ml, wurde für den Bindungstest verwendet (siehe auch Abbildung 1).

Abbildung 1 Schema der Verarbeitung der entnommenen Blutproben



2. Bestimmung der spezifischen Insulinaseaktivität in Erythrocyten

Prinzip:

Im Testansatz spaltet die insulindegradierende Protease radioaktiv markiertes und nicht markiertes Insulin. Dabei entstehen trichlor-essigsäurelösliche Bruchstücke. Zu deren Erfassung werden nach bestimmten Laufzeiten des Tests Proben entnommen, mit Trichlor-essigsäure gefällt, zentrifugiert und schließlich die Radioaktivität des Überstandes gemessen. Diese TCA-lösliche Aktivität nimmt mit der Dauer des Tests linear zu. Beschreibungen des Tests finden sich bei Kolb und Standl (52 u. 53) sowie Schneider (83).

a) Herstellung des Hämolysates

4 ml Erythrocytensuspension in isotoner Kochsalzlösung wurden erneut zentrifugiert, diesmal 10 Minuten bei 1600 g und 20°C. Der Überstand und die graue Schicht der Leukocyten wurden abgesaugt und durch frische isotonische Kochsalzlösung ersetzt. Dieser zweite Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Von dem resultierenden Erythrocytenkonzentrat wurden 200 µl entnommen und im Verhältnis 1 : 11 mit destilliertem Wasser hämolysiert. Dabei wurden mittels einer Eppendorfpipette 200 µl Konzentrat aufgezogen und in ein 2,2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß abpipettiert. Nun wurde bei gedrückter Pipette die Spitze abgenommen und mit einer Glaspipette 2 ml Aqua dest. durch die Spitze in das Reaktionsgefäß eingebracht. Das Hämolysat wurde 30 Sekunden auf einem Rüttler durchgemischt und anschließend bei -18 bis -20°C tiefgefroren. Etwa zwei Stunden später wurde es aufgetaut und getestet.

b) Testansatz und Bestandteile

Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2 ml. Die Inkubationsmischung enthielt 0,5 ml eines Tris-Albuminpuffers, pH 7,4
[Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-HCl: 10 mmol/l; Albumin: 1 mg/ml]

(Humanalbumin, trocken, reinst; Behringwerke; Marburg/Lahn)]. Die Einstellung des pH (7,4 bei 37⁰C) erfolgte an einem Beckman-pH-Meter mit Glaselektrode (Beckman Instruments, München), wobei einmolare HCl bzw. NaOH verwendet wurde. Weiter enthielt die Mischung 0,2 ml Jodacetamid (1 mmol/l Ansatz) (52, 53, 83 u. 96). Als Enzymsubstrat wurden 0,2 ml nicht radioaktiv markiertes Insulin dazugegeben, 50 µE pro ml Ansatz. Verwendet wurde Schweineinsulin, monocomponent, chromatographiert und kristallisiert (1 mg = 25 E; Hormonchemie München). Aus dem kristallinen Insulin wurde zunächst mit 0,001-molarer HCl eine Stammlösung mit der Konzentration von 10 E pro ml hergestellt. In dieser Form wurde das Insulin in einzelnen Portionen bei -20⁰C aufbewahrt. Die weitere Verdünnung der Einzelportionen auf 0,5 mE/ml (entspricht 50 µE pro ml Ansatz) wurde mit Aqua dest. vorgenommen. Das vollständig verdünnte Insulin wurde jeweils eine Woche lang verwendet und bei +4⁰C im Kühlschrank aufbewahrt, dann wieder erneut aus einer Stammlösung hergestellt.

Als Tracer wurden 0,2 ml radioaktiv markiertes Insulin zugefügt. Verwendet wurde mit ¹²⁵Jod markiertes Rinderinsulin, monocomponent (1 mg = 25 E; spezifische Radioaktivität: 23,5 µCi/µg Insulin; Novo Research Institute, Copenhagen/Denmark). Es wurde mit Tris-Albumin-Puffer verdünnt. Im Ansatz waren zwischen 0,09 und 0,10 µCi Radioaktivität enthalten. Dieses Insulin wurde bei -20⁰C in Portionen aufbewahrt, die für einen Ansatz bemessen waren. Die Einzelportion wurde unmittelbar vor Verwendung aufgetaut. 0,2 ml wurden dem Ansatz zugefügt, gleichzeitig je 0,2 ml in zwei Zählröhrchen gegeben und darin die eingesetzte Radioaktivität als Doppelwert bestimmt.

0,4 ml Aqua dest. ergänzten das Inkubationsgemisch, welches in einem Schüttelwasserbad auf genau 37⁰C erwärmt wurde.

c) Testablauf

Das tiefgefrorene Hämolysat wurde aufgetaut, 0,5 ml davon in den Ansatz pipettiert und somit der Test gestartet. Nach 1, 5, 15 und nach 25 Minuten wurde je zweimal (Doppelwerte!) 0,2 ml aus dem Ansatz entnommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße zu ebenfalls 0,2 ml 5 %iger Trichloressigsäure pipettiert und sofort auf einem Mischrotor durchgerüttelt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (10 000 g) zwei Minuten zentrifugiert. Es bildete sich ein durch TCA-Fällung bedingter Niederschlag und ein klarer Überstand, der u.a. die TCA-löslichen Insulinbruchstücke enthielt. Von dem Überstand wurden je 0,2 ml 5 Minuten in einem Gamma-Zähler gezählt. Verwendet wurde das Modell NE 1600 der Firma Nuclear Enterprises (Edinburgh, Großbritannien). Es standen 16 Meßplätze zur Verfügung, die Zählraube betrug 85 %. Alle Meßplätze wurden vor der Zählung leer durchgezählt und ein durchschnittlicher Nulleffekt ermittelt.

d) Hämoglobinbestimmung

Um eine spezifische Aktivität angeben zu können, wurde als Bezugsgröße im Hämolysat eine Hämoglobinbestimmung durchgeführt. Verwendet wurde Merkotest^R Hämoglobin (Merk Darmstadt) entsprechend DIN 58 931 Vornorm.

Prinzip:

Hämoglobin und Derivate werden durch die Reaktionslösung innerhalb von drei Minuten quantitativ in Hämoglobincyanid (Cyan-Methämoglobin) umgewandelt. Der gebildete Farbstoff wird im Photometer gemessen (Spektral- oder Filterphotometer) (34 u. 97).

Reaktionslösung:

1,0 mmol/l Kaliumcyanid
0,6 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat III
2,5 mmol/l Phosphatpuffer pH 7,2
1,5 mmol/l Natriumchlorid
0,05 % Detergens

Ansatz:

Reaktionslösung 5,0 ml
Blut (bzw. Hämolysat) 0,02 ml

Es wird die Extinktion der Analyse gegen die Reaktionslösung gemessen.

Filter: Hg 546 nm

Schichtdicke: 1 cm

Berechnung:

Hämoglobinkonzentrationen = Extinktion x 36,8 g Hb pro 100 ml

Diese Bestimmung wurde für jedes Hämolysat dreifach angelegt.

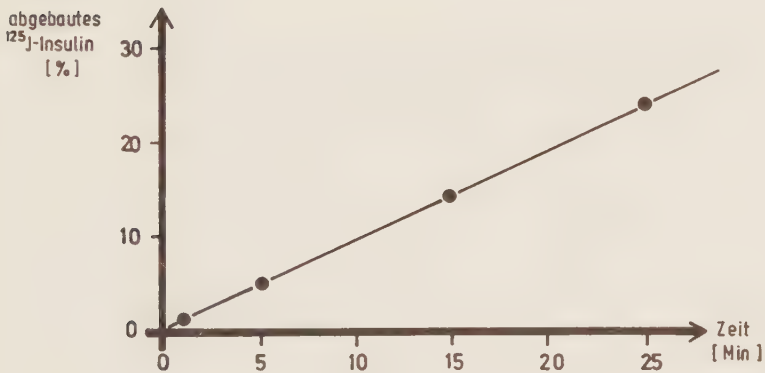
e) Auswertung

Die Zählergebnisse aus dem Gammazähler wurden unter Berücksichtigung des Nulleffektes des Zählers sowie des Verdünnungsfaktors (20 : 1) in Prozent der gesamten eingesetzten Radioaktivität angegeben. Dieser prozentuale Abbau zeigte für die ganze Dauer des Tests (25 Minuten) eine lineare Abhängigkeit von der Zeit, wobei zum Zeitpunkt Null eine Hintergrundaktivität von etwa 4 bis 7 % der eingesetzten Radioaktivität bestand. Die Zählergebnisse wurden um diesen Wert korrigiert und es resultierte eine Gerade, wie sie Abbildung 2 zeigt. Aus der Steigung der Geraden und der Menge des Insulins im Ansatz ließ sich die Insulinaseaktivität pro

Minute ermitteln. Dabei wurde folgende Definition angewendet (52 u. 53).

Eine Einheit ist diejenige Menge an Insulin abbauender Aktivität, die unter oben genannten Bedingungen in einer Minute eine μE Insulin abbaut. Die spezifische Aktivität ist die Aktivität pro mg Hämoglobin im Hämolysat.

Abbildung 2: Beispiel für die Bestimmung der Insulin abbauenden Aktivität in Erythrocyten



3. Bestimmung der spezifischen Bindung von Insulin an Erythrocyten

Prinzip

Eine Inkubationsreihe enthält Erythrocyten sowie aufsteigende Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem Insulin und eine gleichbleibende Menge von ^{125}Jod -Insulin. Entsprechend einer Verdrängungsreaktion an den Bindungsstellen der Erythrocyten nimmt mit steigender Konzentration des kalten Insulins die erythrocytengebundene Radioaktivität ab. Beschreibungen des Tests finden sich bei Gambhir et al. (30 u. 31) sowie Bachmann et al. (4).

a) Vorbereitung der Erythrocyten

10 ml Erythrocytensuspension in isotoner Kochsalzlösung wurden auf 10 ml Ficoll-Paque^R geschichtet (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) (33). Dann wurde 20 Minuten mit 400 g bei 20°C zentrifugiert und anschließend der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe und Absaugpipette entfernt. Die verschiedenen Schichten wurden von oben nach unten einzeln abgesaugt: Kochsalzlösung, Lymphocyten und Ficoll-Paque. Die unterste Schicht der Erythrocyten wurde im Verhältnis 1 : 2 mit Puffer G (siehe unten) gemischt und zehn Minuten mit 400 g bei 10°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Erythrocytenkonzentrat im Verhältnis 1 : 1 mit Puffer G verdünnt. Die entstandene Suspension wurde auf ihren Gehalt an Erythrocyten untersucht. Dazu wurden jeweils zwei Proben (für Doppelwerte) in einem Coulter Counter analysiert (Coulter Counter Modell S plus; Coulter Electronics; Krefeld, Westdeutschland).

Anhang: Puffer G

Zusammenstellung von Gambhir et al. (30 u. 31)

50 mmol/l Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan = Tris-Puffer

50 mmol/l 4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazinäthanol-sulfonsäure

= Hepes-Puffer; pKa = 7,5 bei 25⁰C (Sigma, Taufkirchen
bei München)

10 mmol/l MgCl₂ x 6H₂O

10 mmol/l CaCl₂

2 mmol/l Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA

10 mmol/l Glucose x H₂O

5 mmol/l KCl

50 mmol/l NaCl

1 g/l Humanalbumin, trocken, reinst (Behringwerke, Marburg/
Lahn)

Die Osmolarität des Puffers beträgt 286 mosmol/l. Das pH wurde eingestellt auf 8,0 bei 25⁰C (das Vorgehen wurde unter Punkt III 2.b beschrieben). Zur Lagerung wurde der Puffer portioniert und bei -20⁰C tiefgefroren.

b) Inkubation

Die Inkubationsreihe bildeten zehn 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, in denen je 0,05 ml nicht radioaktiv markiertes Insulin in

aufsteigenden Konzentrationen enthalten war:

Konzentrationen pro ml Ansatz:

μ E	ng
0	0
0,25	0,01
0,5	0,02
1	0,04
5	0,2
10	0,4
50	2
100	4
1000	40
0,25 E	1×10^4

Verwendet wurde Schweineinsulin (1 mg = 25 E; siehe Punkt III 2.b). Zunächst wurde eine Stammlösung mit 25 E pro ml hergestellt, portioniert und tiefgefroren. Dazu diente eine angesäuerte isotone Kochsalzlösung (0,1 ml 1-molare HCl auf 100 ml). Aus diesen Portionen wurden etwa alle 14 Tage Verdünnungsreihen, nun mit Puffer G erstellt entsprechend den oben angegebenen Konzentrationen. Die Konzentration 0 entsprach reinem Puffer G. Dabei wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße (die spätere Inkubationsreihe) je 50 μ l der einzelnen Konzentrationsstufen pipettiert. Diese Verdünnungsreihen wurden ebenfalls bei -20°C tiefgefroren und gelagert.

Als Tracer wurden je 0,05 ml ^{125}Jod -Insulin in die Inkubationsreihe gegeben. Pro ml Ansatz waren 160 pg heißes Insulin enthalten. Zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität (= 100 %) wurden außer der Inkubationsreihe auch drei Zählröhrchen mit je 50 μ l ^{125}Jod -Insulin beschickt und gezählt. Die spezifische Radioaktivität betrug je nach Charge zwischen 211 und 295 μCi pro μg Insulin. Verwendet wurde Mono- ^{125}Jod -(Tyr. A 14)-Insulin (Schweineinsulin, monocomponent; Novo Research Institute; Copenhagen,

Denmark). Das zunächst lyophilisierte Insulin (nebst 1 % Humanalbumin) wurde in destilliertem Wasser aufgelöst. Die weitere Verdünnung erfolgte mit isotoner Kochsalzlösung. Das fertig verdünnte heiße Insulin wurde portioniert und bei -20°C tiefgefroren und gelagert.

In die vorbereitete Inkubationsreihe wurden je 0,40 ml der Erythrocytensuspension pipettiert, so daß insgesamt pro Gefäß 0,5 ml Flüssigkeitsvolumen enthalten waren. Nach Mischung des Inhaltes erfolgte die Inkubation im Schüttelwasserbad bei 15°C . Die Inkubationszeit wurde auf 4,5 Stunden festgelegt (4 u. 30).

c) Isolierung der Erythrocyten

Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße eine Minute lang geschüttelt, dann 2 x 0,2 ml Suspension entnommen und in die 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße der Isolierungsreihe pipettiert. Die Isolierungsreihe wurde als Doppelreihe angelegt, so daß einem Gefäß der Inkubationsreihe zwei Gefäße der Isolierungsreihe entsprachen. In einem Gefäß waren enthalten:

0,2 ml Puffer G

0,2 ml Phtalsäuredibutylester ($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$, Dichte: 1,043; Merk-Schuchard)

0,2 ml Erythrocytensuspension

Puffer G und Phtalsäuredibutylester wurden bereits einige Zeit vor Beendigung der Inkubation vorpipettiert und im Kühlschrank auf $+4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt.

Die Reaktionsgefäße der Isolierungsreihe wurden drei Minuten mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (10.000 g) zentrifugiert. Dabei entstanden drei Schichten [siehe auch Gambhir et al. (31)]:

1. oben die wasserlösliche Phase (Puffer g mit der löslichen Radioaktivität)
2. Phtalsäuredibutylester (keine Radioaktivität)
3. in der Spitze dicht gepackte Erythrocyten (gebundene Radioaktivität)

Zum Abtrennen der Spitzen mit den Erythrocyten wurde eine Einspannvorrichtung angefertigt, in der das zu schneidende Reaktionsgefäß fixiert wurde, so daß die Spitze etwa 20^0 über die Waagrechte hinaus nach oben zeigte. Ein getrenntes Absaugen der beiden flüssigen Schichten erübrigte sich dabei. Die Spitzen wurden knapp hinter den Erythrocyten mit einem Kunststoffschneider abgetrennt (Weller Record Lötpistole Typ 8100 Ca; Cooper Group; Hertogenbosch, Holland). Die abgetrennten Spitzen wurden in Zählröhrchen aufgefangen und fünf Minuten im Isotopenzähler gezählt. Das Gerät wurde unter Punkt III 2. c) aufgeführt.

d) Auswertung

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (nur 40 % der in der Inkubationsreihe eingesetzten Radioaktivität gelangten in ein Gefäß der Isolierungsreihe) ergab sich folgende Formel:

$$\begin{array}{lcl} \% \text{ gebundene} & \text{Radioaktivität der Erythrocyten} & \\ \text{Radioaktivität} = & \frac{\text{eingesetzte Radioaktivität (in}}{200 \mu\text{l Inkubationsmischung)}} & \times 100 \end{array}$$

Bei der Insulinkonzentration von 0,25 E pro ml im Inkubationsansatz ($= 1 \times 10^4$ ng/ml, siehe Literatur 4) fand sich die geringste Bindung von markiertem Insulin, etwa 1 bis 2 %. Diese unspezifische Bindung wurde von den Bindungswerten der anderen Konzentrationsstufen abgezogen und so die spezifische Insulinbindung errechnet. Die spezifische Bindung wurde auf die Erythrocytenzahl

von 4,4 Mio. pro μl Erythrocyten-Puffer G Gemisch normiert, wobei eine lineare Abhängigkeit zwischen Erythrocytenzahl und spezifischer Insulinbindung vorausgesetzt wurde (31).

Mit den gewonnenen Werten wurden Kurven erstellt in einem Koordinatensystem, dessen Abszisse die logarithmisch aufgetragene Konzentration an kaltem Insulin und dessen Ordinate die spezifische Bindung von ^{125}J -Insulin bedeutete. Außerdem wurden sogenannte Scatchard Analysen erstellt (81): Das gebundene Insulin (umgerechnet in ng/ml) wurde als B und das freie Insulin (F) als das gesamte Insulin minus B bezeichnet. In einem neuerlichen Koordinatensystem war B die Abszisse und der Quotient aus B und F die Ordinate. Es ergaben sich wiederum Kurven, deren extrapolierte Schnittpunkt mit der Abszisse den sogenannten R_0 -Wert angibt, ein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen der Erythrocyten.

e) Reticulocytenzählung

Um Blutproben mit erhöhten Reticulocytenzahlen auszuschließen (4, 19, 20, 26 u. 55), wurde in allen Proben eine Reticulocytenzählung durchgeführt (siehe Abbildung 1).

Prinzip:

Vitalfärbung; Vollblut wird mit Brillantkresylblau-Lösung gemischt. Während einer anschließenden Inkubation nehmen die Reticulocyten den Farbstoff auf.

Reagens:

Brillantkresylblau-Lösung (1 %ig in isotoner Kochsalzlösung)

Vorgang:

In ein kleines Kunststoffröhrchen wurden 0,1 ml Brillantkresylblau-Lösung gegeben, 0,1 ml Blut zugeführt und das Röhrchen verschlossen. Der Inhalt wurde sofort gemischt und 15 Minuten bei

Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einem erneuten Mischen wurden dünne Objektträgerausstriche angefertigt. Diese mußten 30 Minuten trocknen.

Mikroskopische Auszählung:

Pro Gesichtsfeld (quadratische Blende im Okular) wurden alle Erythrocyten (einschließlich Reticulocyten) gezählt, dann im selben Gesichtsfeld nur die Reticulocyten. Auf diese Weise wurden an verschiedenen Stellen des Ausstriches, an denen die Erythrocyten nebeneinander lagen, Gesichtsfelder ausgezählt. Wenn 1000 Erythrocyten gezählt waren, wurde die Anzahl der Reticulocyten mit der Benennung $\frac{0}{00}$ angegeben.

Normbereich: 4 bis 15 $\frac{0}{00}$

4. Radioimmunologische Bestimmung von Insulin

Prinzip

Bestimmt wird das immunologisch reaktive Insulin (IRI) im Serum. Zu bestimmendes Serum-Insulin und ^{125}Jod -markiertes Insulin werden entsprechend ihrem Verhältnis von einer konstanten Menge eines spezifischen Antikörpers gebunden. Nach Ablauf der Reaktion werden die gebildeten Insulin-Antikörper-Komplexe vom freien Insulin abgetrennt durch Fällung mit Polyäthylenglycol und Zentrifugation. Die zu messende Radioaktivität des Niederschlags verhält sich umgekehrt zur Konzentration des nicht markierten Insulins.

Verwendet wurde ein Radioimmunbesteck: RIA-gnost^R Insulin (Behringwerke AG, Radiochemisches Laboratorium, Marburg/Lahn (35); siehe auch Literatur 104). Das Besteck wurde nach Erhalt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

a) Vorbereitung der Standards und Proben

Zum Testbesteck gehörten sieben Schweineinsulin-Standards S_0 bis S_6 mit einem Nenngehalt von 0, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 μE Insulin pro ml sowie ein Testserum mit deklariertem Insulingehalt. Es handelte sich um Lyophilisate aus je 0,5 ml Serum, die in 0,5 ml destilliertem Wasser aufgelöst wurden.

Gleichzeitig wurden die aufbewahrten Plasmaproben aufgetaut (siehe Abbildung 1). Da es sich um Plasma handelte, zeigten die Proben nach dem Auftauen eine Nachgerinnung in Form von Fibringerinnsel. Um ein klares Plasma zu erhalten, wurden die Reaktionsgefäße in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (10 000 g) zwei Minuten zentrifugiert.

b) Durchführung der Insulinbestimmung

Für die Standards, das Testserum sowie die zu testenden Proben wurden Doppelwerte angelegt. Das Radioimmunbesteck enthielt dazu Teströhrchen mit folgendem Inhalt: ^{125}Jod -Insulin, je ca. 100 pg, 20 nCi und Anti-Schweinsinsulin-Serum vom Meerschweinchen, beides mit Phosphatpuffer stabilisiert und lyophilisiert. In die ersten 14 Röhrchen wurden die sieben Standards pipettiert, von jedem 2 x 100 μl , und anschließend sofort 500 μl Aqua dest. in jedes Röhrchen dazugegeben. Ebenso wurde mit dem Testserum und den Plasmaproben verfahren. Dann wurden alle Röhrchen auf einem Mischrotor gemischt und zuletzt mit Parafilm abgedeckt.

Die Inkubation erfolgte 20 Stunden bei 20°C . Nach Beendigung wurde mit einer Polyäthylenglykol-Lösung Antikörper-gebundenes und freies Insulin getrennt: Es wurde 1 ml Polyäthylenglykol in jedes Röhrchen pipettiert und anschließend auf dem Mischrotor homogenisiert. Die entstandene trübe Lösung wurde 20 Minuten bei 1700 g zentrifugiert und darauf der Überstand dekantiert.

Die Radioaktivität der Niederschläge wurde eine Minute im Gamma-zähler gemessen. Das verwendete Gerät wurde unter Punkt III 2. c) aufgeführt.

c) Auswertung

Der Insulingehalt der Plasmaproben wurde auf der Standardkurve abgelesen. Dazu wurden die Radioaktivitätswerte von S_0 bis S_6 gegen die zugehörige Insulinkonzentration in ein Kurvenblatt eingezeichnet und durch die Punkte die ideale Kurve gelegt.

5. Semiquantitative Bestimmung von insulinbindenden Antikörpern im Plasma

Prinzip

Zu untersuchendes Serum wird mit ^{125}Jod -Insulin inkubiert. Etwa vorhandene Antikörper binden eine entsprechende Menge des Insulins. Mittels einer Ammoniumsulfatfällung wird anschließend das Gammaglobulin ausgesalzt. Hierbei fällt auch das an Gammaglobulin gebundene Insulin mit aus und kann nach Entfernung des wässrigen Überstandes als Radioaktivität bestimmt werden.

Dieser Test wurde von Kolb und Mitarbeitern ausgearbeitet (100).

a) Vorbereitung der Proben und des Insulins

Die Plasmaproben wurden genauso vorbereitet, wie für den Insulin-RIA bei III. 4. a) beschrieben, anschließend aber im Verhältnis 1 : 1 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt.

Als Tracer wurde mit ^{125}Jod markiertes Rinderinsulin verwendet (23,5 μCi pro μg Insulin; siehe Punkt III 2. b). Das Insulin wurde mit 3 %iger Albuminlösung verdünnt (Humanalbumin, trocken, reinst, Behringwerke, Marburg/Lahn). Nach Verdünnung befanden sich in 10 μl etwa 10 bis 15 nCi Radioaktivität.

b) Inkubation und Sulfatfällung

10 μl verdünntes Plasma wurden mit 10 μl verdünntem ^{125}Jod -Insulin inkubiert. Es wurden extra dünnlumige Reaktionsgefäße verwendet und zur vollständigen Durchmischung der geringen Mengen einige Sekunden zentrifugiert. Die Proben wurden doppelt angesetzt. Inkubiert wurde 20 Stunden im Kühlschrank bei 4°C .

Nach Beendigung wurden 20 μl 80 %ige Ammoniumsulfatlösung zugegeben und die Reaktionsgefäße wiederum kurz zentrifugiert. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde fünf

Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge (10 000 g) zentrifugiert und anschließend die Überstände mittels Wasserstrahlpumpe und Absaugpipette entfernt. Es folgte ein Waschvorgang mit 40 µl 50 %iger Ammoniumsulfatlösung. Darauf wurde noch einmal zentrifugiert und abgesaugt.

c) Auswertung

Bezugsgröße (= 100 %ige Bindung des ^{125}Jod -Insulins) waren 2 x 10 µl des markierten Insulins, eingebracht in zwei Zählröhrchen (für Doppelwerte). Gezählt wurde eine Minute im Gammazähler (siehe Punkt III 2. c). Auch die Reaktionsgefäße mit dem ausgesalzten Gammaglobulin wurden in Zählröhrchen gebracht und gezählt. Die Zählergebnisse wurden in Prozent der Bezugsgröße umgerechnet.

6. Weitere Bestimmungsverfahren

a) Hämoglobin A₁

[Test-Kombination, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, modifiziert nach Schnek und Schroeder (84)].

Prinzip:

Durch nicht-enzymatische Glykosylierung von Hämoglobin kommt es zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes. Das ermöglicht die chromatographische Trennung des glykosylierten Hämoglobins (HbA₁) vom freien Hämoglobin. Dazu wird eine hämolysierte Probe an Ionen^a austauscher gebunden und fraktioniert eluiert. Durch einen Eliminator im Hämolysereagenz wird das labile HbA₁ abgebaut.

Reagenzien:

Inhalt	Konzentrationen der Lösungen
1. Hämolysereagenz	
Borat-Puffer (Eliminator für labiles HbA ₁)	0,7 mol/l; pH 7,0
Detergenz	0,1 %
2. Elutionslösung für HbA ₁	
Phosphatpuffer	ca. 40 mmol/l; pH 6,7
3. Elutionslösung für andere Hämoglobine	
Natriumchlorid	ca. 400 mmol/l
Chromatographiesäulen mit Kationenaustauscherharz	ca. 1 g/Säule

Kontrolle:

Normbereich: HbA₁ Control normal

Pathologischer Bereich und Normbereich: HbA₁ Control Set
(Boehringer Mannheim)

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Hg 405 nm

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Arbeitstemperatur: 23°C

Messung gegen Wasser

Berechnung:

E₁ = Extinktion der HbA₁ Fraktion

E₂ = Extinktion der "anderen Hämoglobine"

E₁ + (4,75 x E₂) = Extinktion des Gesamthämoglobins

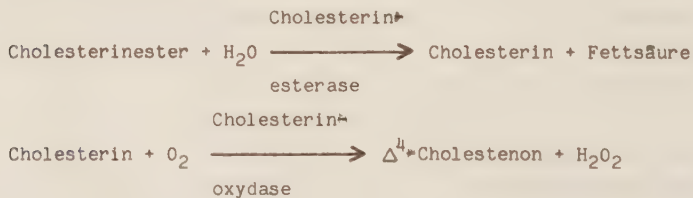
$$1\% \text{ HbA}_1 = \frac{E_1}{E_1 + (4,75 \times E_2)} \times 100$$

b) Cholesterin im Plasma

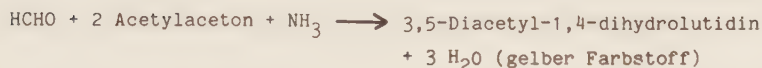
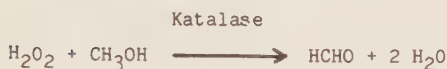
[Biochemica-Test-Kombination, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, modifiziert nach Röschlau et al. (77)]

Prinzip:

Es werden freies Cholesterin und Cholesterinester gemessen (Gesamtcholesterin).



Durch das gebildete Wasserstoffperoxid wird eine stöchiometrische Menge Methanol zu Formaldehyd oxidiert.



Die Intensität des gebildeten Farbstoffes ist der Cholesterinkonzentration direkt proportional. Meßgröße ist die Extinktion.

Reagenzien:

Inhalt	Konzentrationen der Lösungen
1. Ammoniumphosphatpuffer	0,6 mol/l; pH 7,0
Methanol/Katalase	1,7 mol/l; ≥ 700 U/ml
2. Acetylaceton/Methanol	0,42 mol/l; 2,5 mol/l
Hydroxypolyäthoxydodecan	2,1 %
3. Cholesterinesterase	≥ 7 U/ml
4. Cholesterinoxidase	≥ 4 U/ml

Kontrolle:

Richtigkeit: Precinorm^R U, Precipath^R U, Precilip^R

Präzision: Precinorm^R UPX (Boehringer Mannheim GmbH)

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Spektralphotometer 410 nm; Hg 405 nm

Mikro- oder Halbmikro-Küvette: 1 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 37°C

Messung gegen Proben-Leerwert

Berechnung:

bei Hg 405 nm: $c \text{ (mg/dl)} = 528 \times E_{\text{Probe}}$

c) Triglyceride im Plasma

[Biochemica-Test-Kombination, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, modifiziert nach Wahlefeld, A.W. (99)]

Prinzip:

Lipase, Esterase

Triglycerid + 3 H₂O $\longrightarrow$ Glycerin + 3 Fettsäuren

Glycerin läßt sich durch stöchiometrische Umsetzung bestimmen:

Glycerokinase

Glycerin + ATP $\longrightarrow$ Glycerin-1-Phosphat + ADP

Hilfsreaktion:

Pyruvatkinase

ADP + Phospho-Enol-Pyruvat $\longrightarrow$ ATP + Pyruvat

Indikatorreaktion: Lactat-Dehydrogenase

Pyruvat + NADH + H⁺ $\longrightarrow$ Lactat + NAD⁺

Meßgröße ist die Abnahme der Extinktion von NADH.

Reagenzien:

1. 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 4 mmol Magnesiumsulfat,
0,35 mM Natrium-Dodecylsulfat
2. 10 mM NADH, 22 mM ATP, 18 mM PEP
3. LDH $\geq$ 300 U/ml, PK $\geq$ 50 U/ml, Lipase $\geq$ 4000 U/ml,
Esterase $\geq$ 30 U/ml
4. GK $\geq$ 150 U/ml

Kontrolle:

wie bei Cholesterin

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Hg 365 nm

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 20 - 25°C

Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

Berechnung:

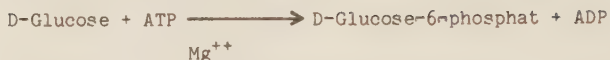
bei Hg 365 nm: $c \text{ (mg/dl)} = 1318 \times \Delta E$

d) Glucose im Kapillarblut

[Biochemica-Test-Kombination, Fa. Boehringer Mannheim GmbH,
modifiziert nach Bergmeyer et al. (9)]

Prinzip:

Hilfsreaktion: Hexokinase



Indikatorreaktion:

G-6-P-Dehydrogenase



Die umgesetzte Glucosemenge entspricht stöchiometrisch der gebildeten Menge NADPH, die durch die Extinktionszunahme photometrisch gemessen wird.

Reagenzien:

Inhalt	Konzentrationen der Lösungen
1. Triäthanolaminpuffer	0,3 mol/l, pH 7,5
MgSO ₄	4 mmol/l
2. NADP	12 mmol/l
3. ATP	15 mmol/l
4. Hexokinase	≥ 125 U/ml
G-6-P-Dehydrogenase	≥ 125 U/ml

Enteweißung mit Perchlorsäure (siehe Punkt III 1.)

Kontrolle:

Normbereich: Precinorm^R U, Precinorm^R S

Pathologischer Bereich: Precipath^R U, Precipath^R S

Präzisionskontrolle: Precinorm UPX (Boehringer Mannheim GmbH)

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Hg 334 nm

Mikro- oder Halbmikroküvette: 1 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 20 - 25°C

Messung gegen Reagenzien-Leerwert (Extinktionszunahme)

Berechnung:

bei Hg 334 nm: $c \text{ (mg/dl)} = 443 \times \Delta E$

7. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert ($\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel) $\pm$ SEM (Standardfehler des arithmetischen Mittels).

Alle Berechnungen wurden durchgeführt mit einem Rechner (Texas Instruments, Modell SR-51-II).

Zur Ermittlung von statistisch signifikanten Korrelationen zwischen verschiedenen Meßgrößen wurde der Regressionskoeffizient, der Ordinatenachsenabschnitt und der Korrelationskoeffizient berechnet.

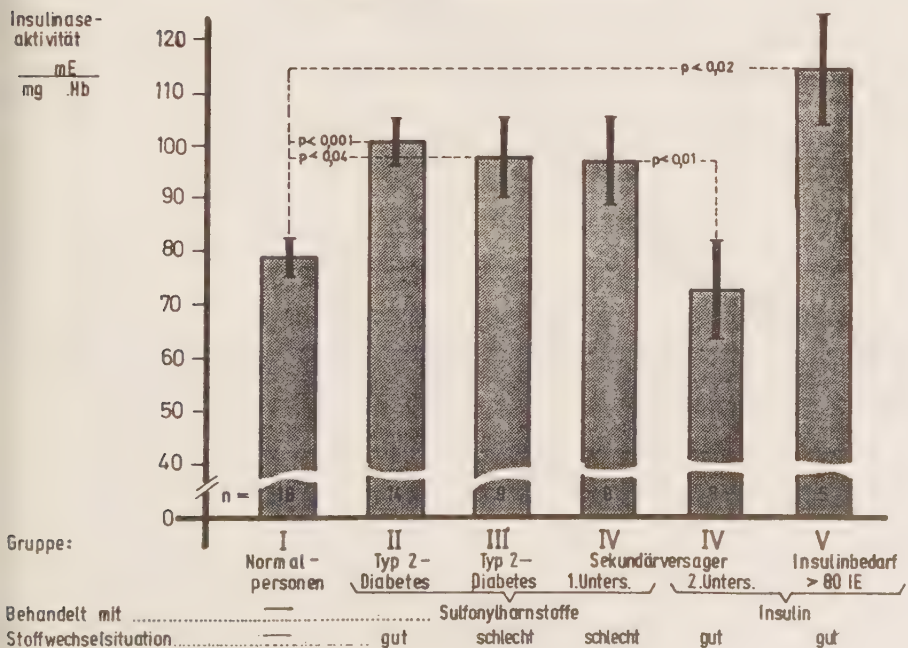
Zum statistischen Vergleich der verschiedenen Gruppen von Typ 2 Diabetikern (Gruppe II, III und V) und der Kontrollgruppe (Gruppe I) wurde der t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben verwendet. Acht Patienten der Gruppe III (Sekundärversager unter Sulfonylharnstofftherapie) wurden auf Insulin umgestellt und nach einer Woche ein zweites Mal untersucht. Um hier den t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte anwenden zu können, wurde eine eigene Gruppe (Gruppe IV) gebildet. Dabei wurden die betreffenden acht Meßwerte der Gruppe III ein zweites Mal für den paarweisen Vergleich verwendet.

IV ERGEBNISSE

1. Insulinaseaktivität in Erythrocyten

Die Insulinaseaktivität war bei den oral eingestellten Diabetikern (Gruppe II und III) gegenüber dem Normalkollektiv (Gruppe I) signifikant erhöht. Zwischen der Gruppe mit guter Einstellung (II) und der mit schlechter Einstellung (III) ergab sich kein Unterschied. Innerhalb der Gruppe der Sekundärversager (Gruppe IV = Gruppe III minus ein Patient) zeigte sich nach einwöchiger Insulinbehandlung und Erreichen einer guten Stoffwechselsituation eine signifikante Abnahme der Insulinaseaktivität auf ein Niveau, das etwa dem des Normalkollektivs entsprach. Die Aktivität des Insulinabbaus erreichte bei den Insulinresistenten (Gruppe V) das höchste Niveau.

Abbildung 3 Insulinaseaktivität in Erythrocyten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$; Einheit der Insulinaseaktivität siehe III 2. e)



2. Insulinbindung an Erythrocyten

Abbildung 4 und 5 zeigen die mittleren Bindungskurven der einzelnen Gruppen, deren Punkte aus den Werten der einzelnen Patienten gemittelt wurden. Die maximale spezifische Insulinbindung der schlecht eingestellten Typ 2-Diabetiker unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe III) war signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) und gegenüber den oral gut eingestellten Typ 2-Diabetikern (Gruppe II, $p < 0,01$). Die Gruppe II wies dabei die höchste Insulinbindung auf. Die Typ 2-Diabetiker mit einem täglichen Insulinbedarf von mehr als 80 IE (Gruppe V) lagen im Bereich der Kontrollgruppe. Bei den Sekundärversagern bewirkte die Umstellung auf Insulin und Verbesserung der Stoffwechsellage eine signifikante Erhöhung ($p < 0,03$) der maximalen spezifischen Insulinbindung auf das Niveau des Normalkollektivs.

Bei den Scatchard Analysen (Abbildung 6 und 7) fiel auf, daß Normalpersonen und oral eingestellte Diabetiker etwa dieselben R_0 -Werte (Anzahl der Bindungsstellen) aufwiesen. Sekundärversager unterschieden sich hier nicht von den gut eingestellten Diabetikern. Es zeigte sich jedoch, daß nach Umstellung auf Insulin die Zahl der Bindungsstellen deutlich abnahm, während - wie oben erwähnt - die maximale Bindung zunahm. Die geringste Anzahl an Bindungsstellen bot die Gruppe der Insulinresistenten (Gruppe V).

Abbildung 4

Mittlere Insulin-Bindungskurven an Erythrocyten bei gesunden Kontrollpersonen und verschiedenen Gruppen von Diabetikern: $\square$ = Kontrollgruppe ($\square$ = $\bar{x} \pm \text{SEM}$); $\bullet$ = Typ 2 Diabetes, gut eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe II); $\circ$ = Typ 2 Diabetes, Sekundärversager unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe III); $\triangle$ = Typ 2 Diabetes mit einem täglichen Insulinbedarf von mehr als 80 IE (Gruppe V).

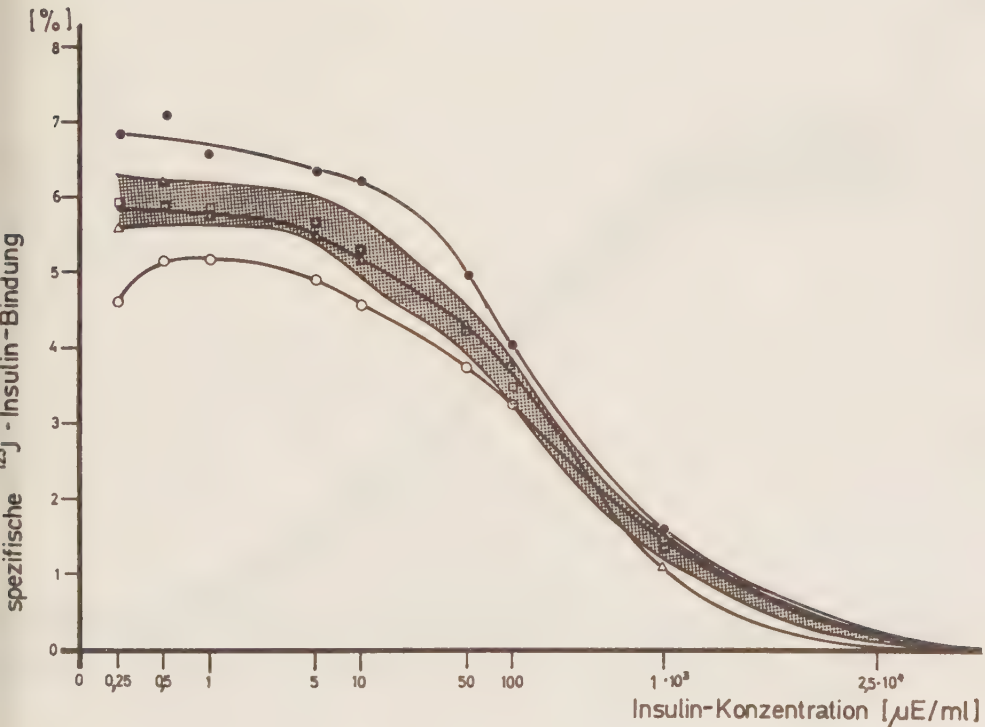


Abbildung 5

Mittlere Insulin-Bindungskurven an Erythrocyten bei gesunden Kontrollpersonen und Sekundärversagern: $\square$ = Kontrollgruppe ($\blacksquare$ = $\bar{x} \pm \text{SEM}$); $\circ$ = Typ 2 Diabetes, schlecht eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie, sogenannte Sekundärversager (Gruppe IV); $\bullet$ = dieselben Patienten (Gruppe IV), gut eingestellt nach einwöchiger Insulintherapie.

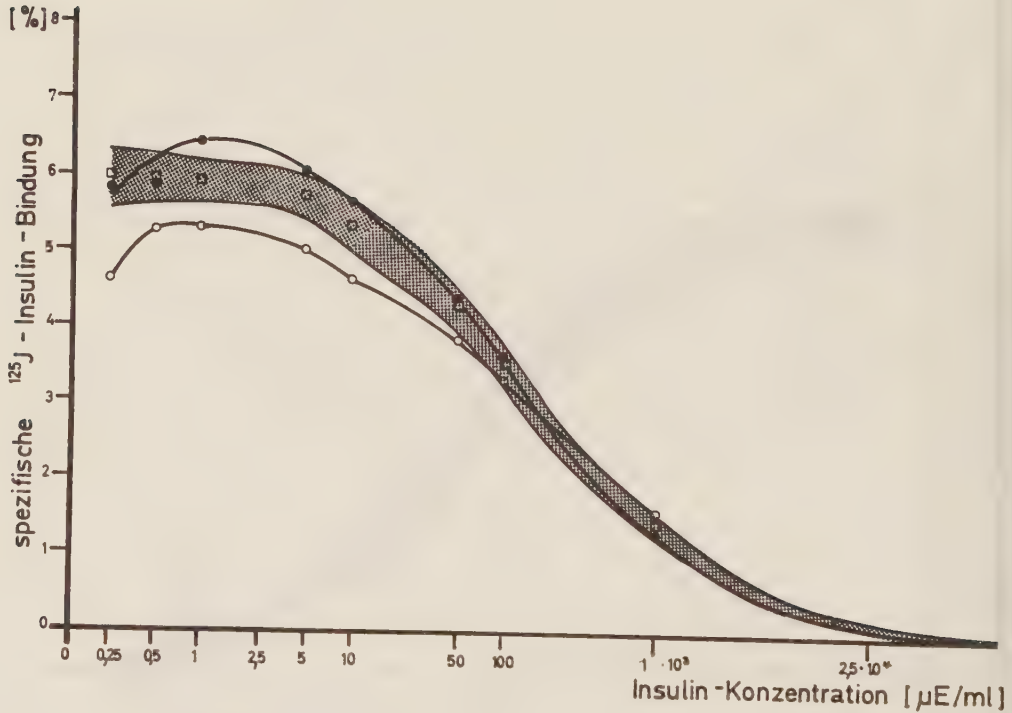


Abbildung 6

Scatchard Analysen der Insulinbindung an Erythrocyten bei gesunden Kontrollpersonen und verschiedenen Gruppen von Diabetikern: $\square$ = Kontrollgruppe (Gruppe I); $\bullet$ = Typ 2 Diabetes, gut eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe II); $\circ$ = Typ 2 Diabetes, Sekundärversager unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe III); Δ = Typ 2 Diabetes mit einem täglichen Insulinbedarf von mehr als 80 IE (Gruppe V).

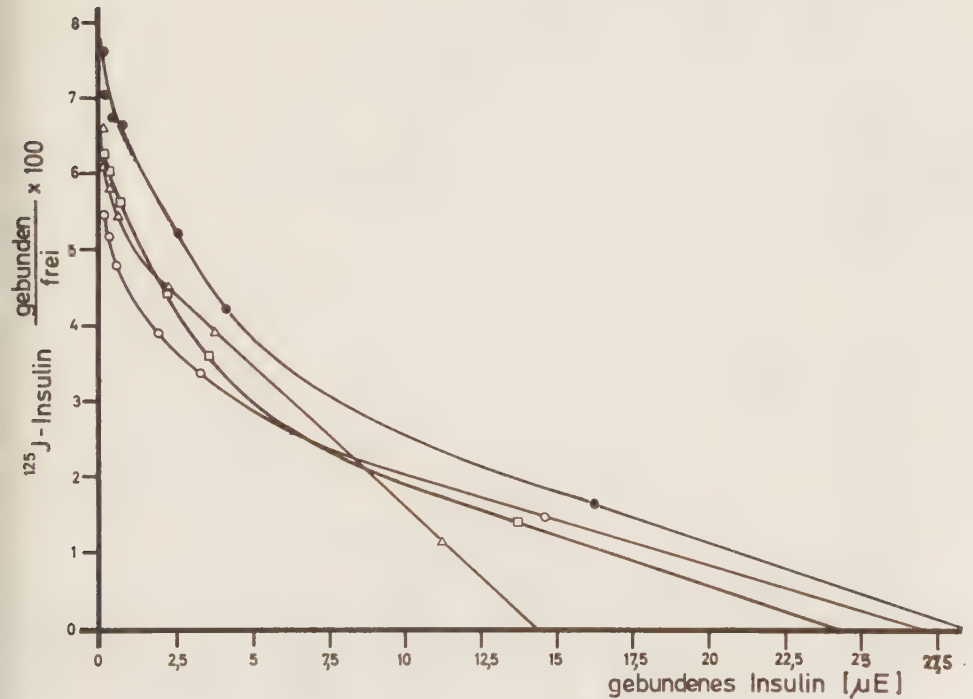
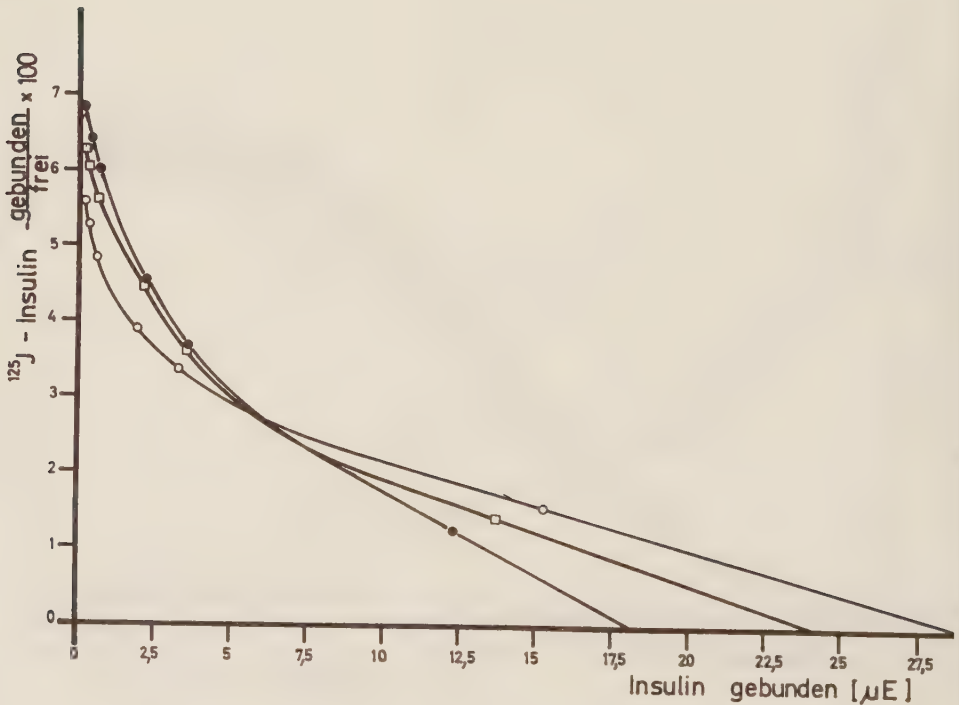


Abbildung 7

Scatchard Analysen der Insulinbindung an Erythrocyten bei gesunden Kontrollpersonen und Sekundärversagern: $\square$ = Kontrollgruppe (Gruppe I); $\circ$ = Typ 2 Diabetes, schlecht eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie, sogenannte Sekundärversager (Gruppe IV); $\bullet$ = dieselben Patienten (Gruppe IV), gut eingestellt nach einwöchiger Insulintherapie.

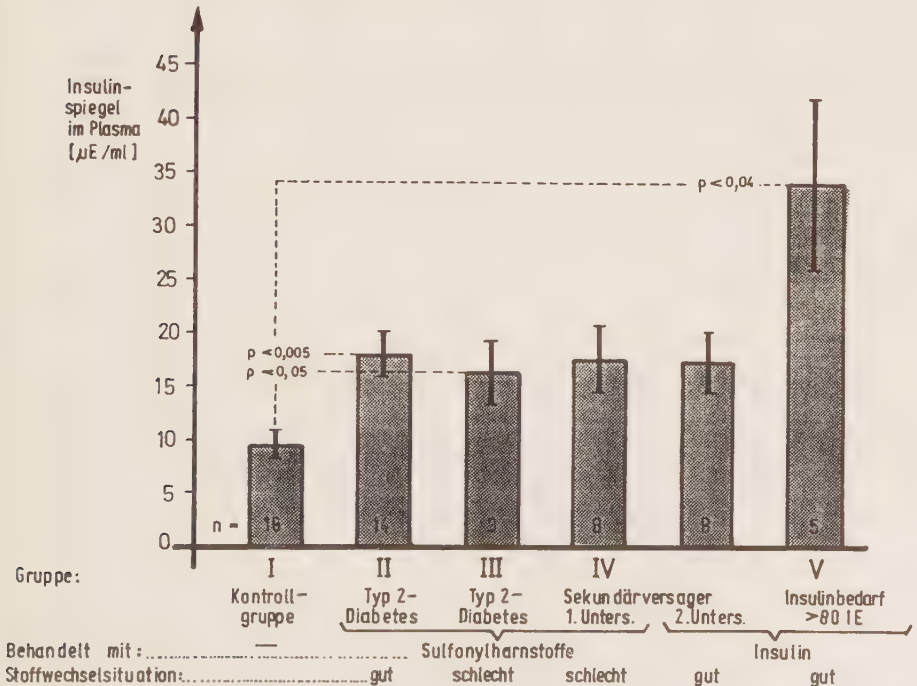


3. Insulinspiegel im Plasma

Die Plasmakonzentrationen des Insulin nach einer mindestens zehnstündigen Nüchternperiode waren in allen Patientengruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 1 sowie Abbildung 8). Die bei weitem höchsten Konzentrationen fanden sich in der Gruppe der insulinresistenten Typ 2 Diabetiker (Gruppe V). Die anderen beiden Patientengruppen (Gruppe II und III bzw. IV) hatten untereinander etwa gleich hohe Insulinspiegel. Auch innerhalb der Gruppe IV bewirkte die einwöchige Insulintherapie und Verbesserung der Stoffwechselsituation keine Veränderung der Plasma-Insulinkonzentration.

Abbildung 8

Insulinkonzentration im Plasma ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)



4. Korrelationen

Eine statistisch signifikante Korrelation fand sich bei den Kontrollpersonen zwischen maximaler spezifischer Insulinbindung und spezifischer Insulinaseaktivität:

$$y = 5,46 x + 45,04; r = 0,60; p < 0,05;$$

Bei den Patientengruppen fand sich keine entsprechende Beziehung. In der Kontrollgruppe fand sich weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen dem Insulinspiegel im Plasma und der spezifischen Insulinaseaktivität:

$$y = 2,06 x + 60,27; r = 0,63; p < 0,05;$$

Im Gegensatz dazu ergab sich bei den Typ 2 Diabetikern eine signifikante negative Korrelation zwischen Insulinkonzentration und spezifischer Insulinaseaktivität (siehe Abbildung 9). Das bedeutet: je niedriger der Insulinspiegel, desto höher ist der Abbau und umgekehrt. Speziell bei den Sekundärversagern (Gruppe III bzw. IV) war diese Beziehung ausgeprägt:

$$y = - 2,01 x + 132,68; r = - 0,76; p < 0,05;$$

Auch die einwöchige Insulintherapie führte zu keiner wesentlichen Änderung:

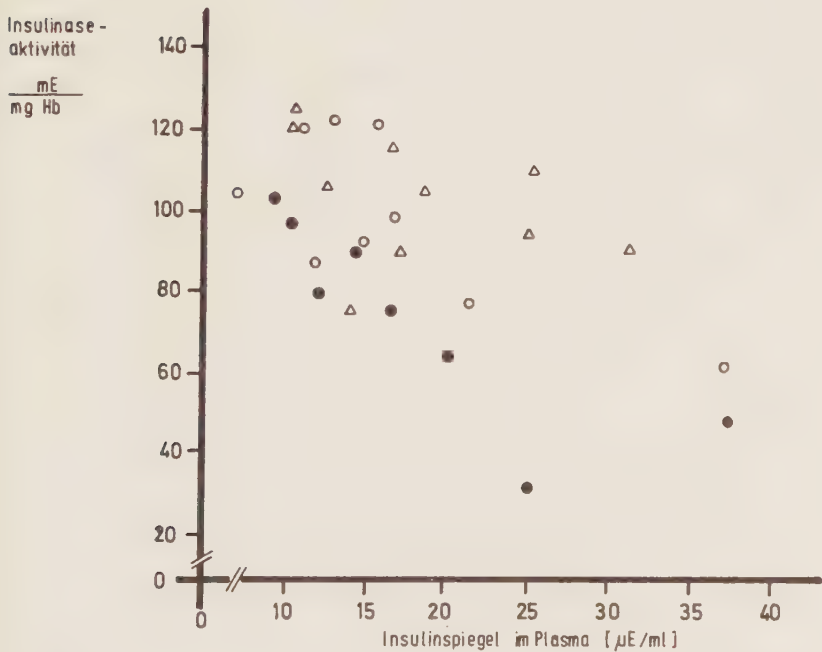
$$y = - 2,81 x + 121,65; r = - 0,87; p < 0,01;$$

Abbildung 9

Korrelation zwischen dem Insulinspiegel im Plasma und der spezifischen Insulinaseaktivität bei verschiedenen Gruppen von Typ 2 Diabetikern: Δ = Diabetes gut eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie (Gruppe II); $\circ$ = Diabetes schlecht eingestellt unter Sulfonylharnstofftherapie, sogenannte Sekundärversager (Gruppe III/IV); $\bullet$ = dieselben Patienten (Gruppe IV), gut eingestellt nach einwöchiger Insulintherapie:

Regressionsgleichung für die gesamten Werte:

$$y = - 1,77 x + 123,24; r = - 0,56; p < 0,01;$$



V. DISKUSSION

1. Zur Pathophysiologie bei Typ 2 Diabetes

Die Pathogenese des nicht insulinabhängigen Typ 2 Diabetes ist derzeit noch nicht restlos aufgeklärt. Sowohl bei der Insulinsekretion als auch bei der Insulinwirkung wurden Veränderungen gegenüber dem Stoffwechselgesunden entdeckt.

In den Siebziger Jahren konnte gezeigt werden, daß die beim Typ 2 Diabetes allgemein erniedrigte Konzentration der Insulinrezeptoren an den Zelloberflächen durch eine Reihe von therapeutischen Maßnahmen gesteigert werden kann: So zum Beispiel durch Beschränkung der Kalorienmenge (2), durch sportliche Betätigung (91) und durch Sulfonylharnstofftherapie (6, 25 u. 69).

Dennoch ist nicht zu übersehen, daß auch beim Typ 2 Diabetes die Betazellen der Langerhans'schen Inseln in aller Regel eine verminderte Funktion zeigen (57 u. 72). Denn auch eine unkomplizierte Adipositas ist vergesellschaftet mit einer abgeschwächten Insulinwirkung und einer Verminderung der Insulinrezeptoren, ohne daß sich daraus in jedem Fall eine pathologische Glukosetoleranz oder ein manifester Diabetes ergäbe (89).

Die Verminderung der Betazellfunktion und die Abschwächung der Insulinwirkung zusammen charakterisieren also den Typ 2 Diabetes. Die vorliegende Arbeit untersuchte einige Aspekte der abgeschwächten Insulinwirkung beim Typ 2 Diabetes sowie den Einfluß verschiedener Therapieformen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Stoffwechselerkrankung.

Unter den vielen denkbaren Möglichkeiten, die zu einer Verminderung der Insulinwirkung führen können, seien erwähnt:

1. eine verminderte Insulinbindung an die Rezeptoren der Zelloberflächen beziehungsweise eine verminderte Rezeptorenzahl,
2. eine verringerte Aktivität der durch Insulin regulierten Rezeptorkinase,

3. eine verminderte Umsetzung des Insulinsignals im Postrezeptorbereich und
4. ein gesteigerter Abbau von Insulin.

Um die hier vorliegenden Ergebnisse einordnen zu können, soll ein kurzer Überblick über bereits vorhandene Erkenntnisse zur Rezeptorbindung und Rezeptorfunktion sowie über den Abbau von Insulin erfolgen: In vitro Untersuchungen von Rezeptoren zeigen, daß die erste Beziehung von Insulin oder auch anderer Peptidhormone mit ihren Zielzellen eine reversible Bindung an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche ist. Im Falle des Insulins ist es bemerkenswert, daß sich Rezeptoren nicht nur auf den bekannten Zielzellen des Hormons finden, sondern auch an vielen anderen Zelltypen ohne bekannte Beeinflussbarkeit durch Insulin. Ein Beispiel hierfür sind die Rezeptoren der Erythrocytenmembran.

Bei 37°C folgt der zunächst reversiblen Bindung des Hormons an die Rezeptoren die Umwandlung in eine irreversible Bindung sowie ein merklicher Abbau des Insulins. Dieser Prozeß ist zeit- und temperaturabhängig (46). Autoradiographische Untersuchungen zeigen einen Transport des Hormons zu den intrazellulären Strukturen einschließlich der Lysosomen (8 u. 17). Gordon et al. (38) sowie Fehlmann et al. (27) fanden an isolierten Hepatocyten von Ratten, daß mit dem Insulin auch sein Rezeptor in Form einer Endocytose in die Zelle aufgenommen wird und damit das Insulin selbst regulierend auf die Anzahl der Rezeptoren einwirkt (90). Zu einem ähnlichen Schluß kamen Marshall und Olefsky (59) bei Fettzellen. Möglicherweise geht der Endocytose des Insulin-Rezeptor-Komplexes eine Aggregation der Rezeptoren auf der Zelloberfläche voraus (82). Harmon et al. (43) beschrieben an Leberzellen von Ratten eine Konformationsänderung des Rezeptors unmittelbar nach Bindung des Insulins.

In jüngster Zeit ist es nun gelungen, den Aufbau des Rezeptors teilweise aufzuklären. Auch bezüglich der Vermittlung des Insulin-

signals an intrazelluläre Zielorte konnten Fortschritte erzielt werden.

Nach diesen Ergebnissen besteht der Rezeptor aus zwei Untereinheiten (48). Die Alpha-Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 135 000 und bindet wahrscheinlich das Insulin (103 u. 105). Die Beta-Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 95 000. Sie besitzt eine Proteinkinaseaktivität, die durch Insulin reguliert wird (47 u. 49). Diese sogenannte Rezeptorkinase ist Tyrosin-spezifisch und sie führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors, das heißt: energiereiche Phosphatgruppen werden von ATP auf Tyrosinreste des Rezeptors übertragen (3, 47, 49, 88 u. 102). Diese Autophosphorylierung konnte auch bereits für die Insulinrezeptoren menschlicher Erythrocyten nachgewiesen werden (41).

In vitro spielen zwei Faktoren (möglicherweise noch mehr) eine wesentliche Rolle in der Regulation des Enzyms: Insulin steigert die maximale Umsatzrate und Mn^{2+} setzt die Michaeliskonstante herab (102).

Eine Reihe von Tatsachen spricht dafür, daß die Aktivierung dieser Rezeptorkinase der erste Schritt in der Übermittlung des Insulin-signals sein könnte. Die Bedeutung der Rezeptorkinase sowie der Phosphorylierung des Rezeptors wird durch jüngste Beobachtungen unterstrichen, wonach in einigen Fällen von ausgeprägter Insulin-resistenz eine deutlich verminderte Aktivität der Rezeptorkinase beziehungsweise ein Defekt in der Phosphorylierung des Insulin-rezeptors gefunden wurde (40 u. 42). Diese Beobachtungen wurden an Erythrocyten, Monocyten und Fibroblasten erhoben.

Weitere Schritte der Signalübermittlung im Postrezeptorbereich sind derzeit noch nicht abgrenzbar. Zwar bestehen einige Hinweise für die Existenz eines sogenannten Second Messengers (86 u. 87), doch konnte dessen genaue Natur bisher nicht geklärt werden. Generell müssen bei der Diskussion der verminderten Stoffwechselantwort auf Insulin stets auch Veränderungen im Postrezeptorbereich mit in die Überlegungen eingehen, zumal dieser Bereich sehr groß

und vielfältig sein dürfte.

Der Insulinabbau in vivo wird allgemein als zellulärer Prozeß angesehen. Nach allen bisherigen Erfahrungen findet im Blutplasma kein nennenswerter Abbau statt. Allenfalls durch Enzymverlust von Zellen kann bei gewissen in vitro Untersuchungen ein Abbau vorge-
täuscht werden.

Die zelluläre Insulindegradation wird entweder durch den Rezeptor vermittelt oder sie ist vom Rezeptor unabhängig (37, 92 u. 93). Es besteht weitgehende Einigkeit darüber, daß der Rezeptor selbst keine oder nur geringe abbauende Aktivität besitzt. Lang et al. (56) konnten bei menschlichen Lymphocyten mittels Polyacrylamid-
gel-Elektrophorese die Insulinaseaktivität von der Bindungsaktivität trennen.

2. Zur Untersuchung der Insulinaseaktivität

Schon länger wurde ein erhöhter Insulinabbau als theoretische Ursache für eine verminderte Insulinwirkung angesehen [Mirsky 1964 (61)]. Doch bis jetzt wurde in der Literatur erst in einigen Fällen von erhöhtem Insulinabbau bei insulinresistenten Diabetikern berichtet.

Kitabchi et al. (51), Maberly et al. (58) und Paulsen et al. (70) fanden einen verstärkten Insulinabbau im Muskel- und Fettgewebe in Fällen von ausgeprägter Insulinresistenz. McElduff et al. (60), Misbin et al. (62) und Müller et al. (64) konnten einen Zusammen-
hang zwischen Insulinresistenz und Insulinabbau zeigen.

Blazar et al. (10) berichten von einer extrem insulinresistenten Patientin mit stark erhöhter Insulinaseaktivität im subcutanen Fettgewebe. Durch eine hochdosierte Therapie mit Chloroquinphosphat konnte sowohl der erhöhte Abbau als auch der klinische Zu-
stand der Insulinresistenz drastisch verbessert werden. Der Einfluß von Chloroquinphosphat auf die intrazelluläre Verwertung und den Abbau des Insulins wurde an anderer Stelle beschrieben (23).

Die vorliegende Untersuchung behandelte mehr generell die Veränderungen in der Insulinaseaktivität der Erythrocyten bei verschiedenen Gruppen von Patienten mit Typ 2 Diabetes.

Das hier untersuchte Enzym Insulinase wurde von Kolb und Standl (52 u. 53) aus menschlichen Erythrocyten dargestellt und gereinigt. Es handelt sich um eine Protease, deren Aktivität an freie Sulfhydrylgruppen gebunden ist.

1 mg des gereinigten Enzyms spaltet 50 pmol oder 8 mE Insulin pro Minute in trichloressigsäurelösliche Spaltprodukte (52).

Nach Reinigung erweist es sich als homogen und zeigt in der Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrofocussierung eine einzige Proteinbande. Das Molekulargewicht wird mit 150 000 bis 160 000 angegeben, wobei das Enzym sich in vier identische Untereinheiten spalten läßt. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,8. Die Spezifität und Selektivität für Insulin als Substrat ist hoch. So werden andere Proteohormone wie Wachstumshormon, Prolactin und Thyreotropin nicht angegriffen. Im Gegensatz zur Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (1 u. 98) baut die Protease Insulin bei physiologischen Hormonkonzentrationen ab, wobei Peptide entstehen, die kleiner sind als die A-Kette des Hormons, was den proteolytischen Charakter des Enzyms bestätigt. Im übrigen konnte die Insulinaseaktivität durch eine Reihe von Proteaseninhibitoren gehemmt werden (52 u. 53).

Obwohl die roten Blutkörperchen nicht zu den bekannten Zielzellen der Insulinwirkung gehören, haben sie Insulinrezeptoren und die erythrocytäre Insulinaseaktivität zeigt weitgehend ähnliche Eigenschaften wie die Insulin-abbauenden Proteasen der insulinsensitiven Gewebe tierischen Ursprungs (13, 14, 15, 16, 22 u. 106). Eine besondere Ähnlichkeit besteht zum entsprechenden Enzym, das kürzlich von Neal (66) aus dem menschlichen Skelettmuskel gewonnen und gereinigt wurde.

Die erythrocytäre Insulinaseaktivität, wie sie hier gemessen wurde, enthielt keine Glutathion-vermittelte Transhydrogenaseaktivi-

tät und wurde auch nicht durch freie Sulfhydrylgruppen im Hämoly-
sat beeinflusst, da dem Testansatz 1 mmol/l Jodacetamid hinzugefügt
wurde (52). Eine Geschlechts- oder Altersabhängigkeit wurde ausge-
schlossen durch Untersuchung an 169 Normalpersonen (83).

Die vorliegenden Messungen erfolgten im physiologischen pH-Ber-
reich, was dem pH-Optimum des Enzyms entspricht (53 u. 83). Meh-
rere pH-Bestimmungen im Testansatz vor Zugabe von ^{125}J -Insulin
ergaben einen pH-Wert von 7,3. Ebenso wurde die Versuchstemperatur
von 37°C genau eingehalten. Bei dieser Temperatur zeigte die Reak-
tion über mehr als 30 Minuten eine strenge Linearität (83). Im
vorliegenden Fall betrug die Inkubationszeit 25 Minuten. Während
dieser Zeit zeigte die Protease eine lineare, zeitabhängige Kine-
tik mit kontinuierlicher Zunahme der meßbaren Radioaktivität, also
der Insulinspaltprodukte (siehe Abbildung 2). Die Trennung der
Spaltprodukte vom intakten Insulin erfolgte nach der Trichlor-
essigsäure-Methode (53), wobei die Spaltprodukte im trichlor-
essigsäurelöslichen Überstand enthalten sind, jedoch das intakte
Insulin und sicherlich auch initiale Spaltprodukte wegen ihrer
Größe ausgefällt werden und im Niederschlag erscheinen. Die voll-
ständige Umwandlung des Insulins in die Spaltprodukte konnte eben-
so wie die Löslichkeit dieser Peptide in Trichloressigsäure mit-
tels Sephadex-Chromatographie nachgewiesen werden (52 u. 53).
Hierbei ist jedoch nicht auszuschließen, daß bei Reaktionsbeginn
initiale große Spaltprodukte entstehen, die in der Sephadex-Chro-
matographie vom intakten Insulin nicht zu unterscheiden sind, und
auch, wie oben erwähnt, mit der Trichloressigsäure-Methode nicht
erfaßt werden, da sie nicht im löslichen Überstand enthalten sind.
Dieser Fehler dürfte die Ergebnisse jedoch kaum verfälschen, etwa
im Sinne einer Unterschätzung des wahren Abbaus, da die Enzymakti-
vität aus der Zunahme der löslichen Radioaktivität über einen
längeren Zeitraum (25 Minuten) ermittelt wurde (siehe auch Punkt
III 2.). Außerdem ergaben die vier Einzelmeßwerte, wie Abbildung 2
an einem typischen Beispiel zeigt, eine sehr streng lineare Re-

gressionsgerade.

Ein Aktivitätsverlust durch Lagerung wurde vermieden, indem sämtliche Hämolysate am Tage der Blutabnahme getestet wurden.

In der vorliegenden Arbeit lag die Insulinaseaktivität aller oral eingestellten Diabetiker (Gruppe II und III) signifikant über dem Bereich der Kontrollgruppe (Gruppe I). Zwischen der Gruppe mit guter (II) und der mit schlechter Stoffwechselsituation (III) ergab sich kein Unterschied. Die Insulinaseaktivität war also in beiden Gruppen gleichermaßen erhöht, unabhängig von der Qualität der Einstellung unter Sulfonylharnstofftherapie und Diät. Jedoch erbrachte die Umstellung der Sekundärversager (Gruppe IV = Gruppe III minus 1 Patient) nach einwöchiger Insulinbehandlung und Erreichen einer guten Stoffwechselsituation eine signifikante Abnahme der Insulinaseaktivität auf ein Niveau, das etwa dem der Kontrollgruppe entsprach. Die höchste Aktivität zeigte die Gruppe der fünf Typ 2-Diabetiker mit ausgeprägter Insulinresistenz. Sie hatten einen täglichen Insulinbedarf von mehr als 80 IE, wobei in keinem Fall ein abnorm erhöhter Titer von zirkulierenden Insulinantikörpern gefunden werden konnte (siehe Abbildung 3).

Außerdem erbrachte die vorliegende Untersuchung Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Insulinaseaktivität einerseits und maximaler spezifischer Insulinbindung wie auch Plasmainsulinspiegel andererseits. In der Kontrollgruppe war in beiden Fällen eine signifikante positive Korrelation zu ermitteln. Im Gegensatz dazu ergab bei den Typ 2-Diabetikern der Vergleich von Insulinaseaktivität und Insulinspiegel eine signifikante negative Korrelation (siehe Abbildung 9). Das bedeutet, daß ein niedriger Insulinspiegel mit einer erhöhten Abbaurate zusammentrifft und umgekehrt. Speziell bei den Sekundärversagern war diese Beziehung ausgeprägt. Allerdings führte auch die einwöchige Insulintherapie hierbei zu keiner

wesentlichen Änderung.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Berichten in der Literatur:

Duckworth et al. (21) beobachteten einen erhöhten Insulinabbau im Skelettmuskelgewebe von Ratten, bei welchen mit Streptozotocin ein Insulinmangeldiabetes erzeugt worden war. Gleichzeitig bestand eine erhöhte Insulinbindung an die Muskelzellen. Durch eine einwöchige Insulintherapie kehrten beide Werte zur Norm zurück.

Einen Zusammenhang zwischen basalem Plasmainsulinspiegel und Insulinaseaktivität von Muskel- und Fettzellen fanden Kitabchi et al. (51) bei Gruppen von Diabetikern und einer Kontrollgruppe. Dabei waren Insulinresistenz und Hyperinsulinämie signifikant mit einer erhöhten Insulinaseaktivität korreliert.

Zwar fand sich in der vorliegenden Arbeit bei den Insulinresistenten keine direkte Korrelation zwischen Hyperinsulinämie und Insulinaseaktivität, doch liegt dies wahrscheinlich an der geringen Patientenzahl dieser Gruppe ($n = 5$). Immerhin zeigt sich im Vergleich mit den anderen Gruppen sowohl der höchste Insulinspiegel als auch die höchste Insulinaseaktivität in der Gruppe der Insulinresistenten. In beiden Fällen liegen die Mittelwerte signifikant über der Kontrollgruppe. Es kann also auch in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und gesteigerter Insulinaseaktivität gesehen werden. Insgesamt dürfen diese Befunde wohl dahingehend interpretiert werden, daß die Insulinaseaktivität induzierbar ist und so den Insulinstoffwechsel wie auch die Insulinwirkung am Zielgewebe beeinflusst, wobei sowohl Insulinmangel als auch Insulinresistenz mit einer gesteigerten Insulinaseaktivität einhergehen können (21, 51 u. 66).

Dennoch darf nicht übersehen werden, daß die vorliegenden Ergebnisse in vitro ermittelt wurden und außerdem an Erythrocyten, die nicht zu den bekannten Zielgeweben des Insulins gehören, aller-

dings leicht zu gewinnen sind.

Inzwischen lieferten in vivo Untersuchungen durch Bestimmung der Insulinclearance neue Gesichtspunkte zur Insulinempfindlichkeit und Insulinresistenz (28, 67 u. 73). Philippe et al. (73) entdeckten bei Streptozotocin-diabetischen Ratten eine erhöhte Insulinclearance in Verbindung mit einem erhöhten Abbau sowie einer erhöhten Insulinbindungskapazität. Durch eine einwöchige adäquate Insulintherapie ließen sich alle drei Befunde normalisieren, wie der Vergleich mit einer Kontrollgruppe zeigte.

Diese in vivo Beobachtungen passen gut mit den in vitro Ergebnissen von Duckworth (21) zusammen. Nosadini et al. (69) stellten bei pankreatektomierten Patienten fest, daß eine hohe Insulinempfindlichkeit der Gewebe mit einer gesteigerten Zahl von Bindungsstellen und einer erhöhten Abbaurate einhergeht und umgekehrt fanden Flier et al. (28) bei insulinresistenten Patienten eine stark erniedrigte Insulinclearance. Es finden sich also mehrere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Clearance, Bindung und Insulinsensitivität der Gewebe.

Dennoch fehlt bisher der eindeutige Beweis, daß eine erhöhte Insulinaseaktivität in insulinsensitiven Geweben ein konstantes Merkmal des Typ 2 Diabetes in vivo ist und daß diese erhöhte Aktivität die periphere Insulinresistenz der Patienten tatsächlich mitverursacht. Diese Frage gewinnt an Bedeutung, da sich mittlerweile die Ansicht durchsetzt, daß Postrezeptordefekte die vorwiegende Ursache der Insulinresistenz beim Typ 2 Diabetes sind und nicht nur Abnormitäten auf der Rezeptorebene (11, 54, 76, 80 u. 89). Scarlett et al. (80) beobachteten, daß bei sechs zunächst unbehandelten Typ 2 Diabetikern eine 14-tägige Insulintherapie eine wesentliche Erhöhung der maximal durch Insulin stimulierbaren Glucoseutilisation bewirkte. Die Insulinbindung veränderte sich dagegen nur unwesentlich. Dies könnte darauf hinweisen, daß eine Insulintherapie den Postrezeptordefekt deutlich verbessert und daß

dieser Defekt durch den Insulinmangel hervorgerufen wird. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die in der vorliegenden Arbeit festgestellte erhöhte Insulinaseaktivität der Erythrocyten verwiesen, die sich bei allen oral eingestellten Typ 2 Diabetikern zeigte, unabhängig von der Qualität der Stoffwechselsituation und die (als möglicher Postrezeptordefekt) nur durch Insulintherapie auf das Niveau der Kontrollgruppe gesenkt werden konnte.

3. Zur Untersuchung der Insulinbindung

Wenn auch die genaue Bedeutung der Insulinbindung an die Zytoplasmamembranen der einzelnen Gewebe noch nicht geklärt ist, so wird doch allgemein darin die initiale Schlüsselfunktion der Insulinwirkung gesehen (7, 36 u. 92).

Zu den Charakteristika des Typ 2 Diabetes gehört - wie bereits erwähnt - neben einer verminderten Funktion der Beta-Zellen in den Langerhans'schen Inseln eine verminderte Antwort im Stoffwechsel der einzelnen Gewebe auf Insulin, die jedoch im Einzelfall nicht immer gleich ausgeprägt ist. In schweren Fällen wird sie als Insulinresistenz bezeichnet.

In solchen Fällen einer Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetikern wurde eine verminderte Insulinbindung beschrieben (18, 45, 68 u. 78). Diese verminderte Bindung wurde auf eine reduzierte Anzahl von Rezeptoren zurückgeführt (68 u. 78). In der vorliegenden Arbeit fand sich dafür kein Anhalt. Allerdings war die Gruppe der klinisch Insulinresistenten mit fünf Patienten sehr klein und die Streuung der Einzelwerte sehr groß, so daß in diesem Punkt keine Aussage gemacht werden kann.

Jüngste Beobachtungen weisen auch auf eine verminderte Aktivität der Rezeptorkinase als mögliche Ursache für die Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetikern hin (40 u. 42); (siehe hierzu Punkt V 1.). Die Bestimmung der spezifischen Insulinbindung an Erythrocytenmembranen war sehr viel aufwendiger als die Bestimmung der Insu-

linaseaktivität. Der Test wurde nach Gambhir et al. durchgeführt (30 u. 31). Da hierfür intakte und biologisch aktive Erythrocyten erforderlich waren, mußten die Blutproben äußerst schonend verarbeitet werden: Nach Blutabnahme wurden die Proben im Eiswasserbad abgekühlt und sofort in das Labor transportiert. Das Zentrifugieren erfolgte stets bei niedriger Drehzahl (400 x g), um möglichst jede Beeinträchtigung der Membranstruktur und der Rezeptorfunktion zu vermeiden. Zur Abtrennung von anderen zellulären Blutbestandteilen wie Leukocyten, Lymphocyten und auch Reticulocyten wurden die Proben auf Ficoll-Paque nach Boyum (12) geschichtet und zentrifugiert. Außerdem wurden bei jedem Waschvorgang beim Absaugen nicht nur der Überstand, sondern auch die oberen Zellschichten einschließlich der oberen Erythrocytenschicht abgesaugt. Auf diese Weise sollten möglichst viele Reticulocyten und junge Erythrocyten entfernt werden.

Der vielfach verwendete Puffer G (siehe Punkt III 3.) wurde in gebrauchsfertigen Portionen bei -20°C gelagert und war so vor Veränderung durch Bakterien- oder Pilzbefall geschützt.

Ein weiteres Problem war die exakte Trennung der gebundenen Radioaktivität von der löslichen. Nach bisherigen Beschreibungen (30 u. 31) mußten die oberste Schicht mit der gelösten Radioaktivität und die nicht radioaktive Schicht des Phthalsäuredibutylesters in zwei Arbeitsgängen getrennt abgesaugt werden. In einem dritten wurden dann die Spitzen der Reaktionsgefäße mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Durch die bei den Methoden unter III 3. c) beschriebene Einspannvorrichtung bewegten sich die beiden flüssigen Schichten zum Deckel des Gefäßes und die Spitzen mit den Erythrocyten konnten unmittelbar abgetrennt werden. Auf diese Weise wurden Fehlerquellen umgangen, wie zum Beispiel durch Abrutschen beim Absaugen und durch das insgesamt recht lange Manipulieren.

Bei den vorliegenden Testergebnissen fand sich nur eine geringe unspezifische Bindung von deutlich unter zwei Prozent, was mit der

Literatur (30 u. 31) gut übereinstimmt.

Die Menge an nativem Insulin, die notwendig war, um die maximale Bindung um die Hälfte zu reduzieren, lag im Bereich physiologischer Insulinkonzentrationen.

Die maximale spezifische Bindung der Kontrollgruppe ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien (4, 18 u. 20). Die höchste Insulinbindung zeigten die unter Sulfonylharnstofftherapie gut eingestellten Typ 2 Diabetiker (siehe Abbildung 4). Dagegen zeigten die Sekundärversager die geringste Bindung. Der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen war signifikant (siehe Punkt IV 2.). Die Umstellung und einwöchige Insulintherapie führte bei den Sekundärversagern zu einer signifikanten Steigerung der maximalen spezifischen Insulinbindung. Auf die Probleme bei der Gruppe der Insulinresistenten wurde weiter oben bereits hingewiesen. Bei den Analysen nach Scatchard (81) (siehe Abbildung 6 und 7) fällt auf, daß der R_0 -Wert als direktes Maß für die Rezeptorzahl bei allen insulinbehandelten Gruppen (Gruppe IV und V) deutlich unter dem Wert der Kontrollgruppe liegt. Dieser Befund paßt zu den Beobachtungen von Fehlmann et al. (27), Gorden et al. (38) sowie Marshall und Olefsky (59), woraus hervorgeht, daß der Insulinrezeptor nach Bindung des Insulinmoleküls in Form einer adsorptiven Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. Auf diesem Wege kann ein Hyperinsulinismus zu einer Verminderung der Rezeptorzahl führen (90), wobei beim insulinbehandelten Diabetes und speziell bei Insulinresistenz meistens ein erhöhter Plasmainsulinspiegel zu finden ist.

Andererseits fanden sich bei den Patienten unter Sulfonylharnstofftherapie normale bis leicht erhöhte R_0 -Werte, unabhängig von der Qualität der Stoffwechselsituation. Auch diese Beobachtung befindet sich im Einklang mit der vorhandenen Literatur (6, 25, 69 u. 89).

Dennoch darf bei der Betrachtung der R_0 -Werte nicht übersehen werden, daß es sich dabei um einen graphisch extrapolierten Wert handelt, der noch dazu sehr stark von einem einzigen Meßpunkt

abhängt (siehe Abbildung 6 und 7).

Generell muß bei der Bestimmung der spezifischen Insulinbindung an Erythrocyten bedacht werden, daß es sich hierbei um langlebige Restzustände ehemals vollständiger Zellen handelt, die eine ganze Reihe von typischen Zellfunktionen verloren haben. Vielleicht ist auch die Fähigkeit, Insulin spezifisch zu binden, eine allmählich abnehmende Funktion, die speziell für die kernhaltigen Vorstufen des Erythrocyten einmal wichtig war.

Für diese Hypothese finden sich gewisse Anhaltspunkte: So verfügen andere kernhaltige Zellen des Blutes, zum Beispiel Monocyten, auch über spezifische Insulinrezeptoren sowie über die Fähigkeit zur adsorptiven Endocytose (20, 32 u. 85). Im Gegensatz dazu nimmt bei den kernlosen Erythrocyten des peripheren Blutes die Insulinbindung und die Rezeptordichte mit dem Zellalter ab. Reticulocyten haben bei weitem die höchste Bindungskapazität (20, 26, 55, 94, 95 u. 101). Dons et al. (19) stellen dabei sogar eine exponentielle Abnahme der Insulinbindung mit dem Erythrocytenalter fest. Außerdem besitzen auch nur junge Erythrocyten die Fähigkeit zur Endocytose (107). Da die periphere Erythrocytenpopulation bezüglich der Alterszusammensetzung sehr heterogen ist, dürfte auch die Insulinbindung von Fall zu Fall erheblichen Schwankungen unterliegen.

Die bisweilen deutlich divergierenden Einzelergebnisse, besonders in der Gruppe mit ausgeprägter Insulinresistenz, könnten darauf zurückzuführen sein.

Die Reticulocytenzählung erlaubt nur sehr ungenaue Rückschlüsse auf die aktuelle Zusammensetzung der gesamten Population. Wesentlich aussagekräftiger wäre eine Bestimmung des mittleren Zellalters. Hierfür fehlt aber bis jetzt eine einfache Methode.

So kann eine Interpretation der hier vorliegenden Bindungswerte nur sehr vorsichtig erfolgen. Vor allem sind Rückschlüsse auf andere Zellarten kritisch zu prüfen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des insulinabbauenden Enzyms Insulinase in Erythrocyten sowie der Insulinbindung an die Erythrocytenmembran bei Typ 2 Diabetikern. Ergänzend wurde der freie Plasmainsulinspiegel bestimmt. Untersucht wurde eine Kontrollgruppe mit 16 stoffwechselgesunden Personen und 36 Typ 2 Diabetikern: 14 Patienten waren mit Diät und Sulfonylharnstofftherapie gut eingestellt, 9 waren unter dieser Therapie schlecht eingestellt. Von diesen sogenannten Sekundärversagern der oralen Therapie wurden 8 nach Umstellung auf Insulin und Erreichen einer guten Stoffwechselsituation ein zweites Mal untersucht. 5 weitere Patienten hatten einen Insulinbedarf von mehr als 80 IE pro Tag. Außerdem wurde der Blutzucker, der Cholesterin- und Triglyceridspiegel sowie der HbA_{1c}-Wert bestimmt. Die Blutabnahmen erfolgten nüchtern, die Bestimmung des Blutzuckers postprandial.

Die beschriebene Insulinase ist bei früheren Untersuchungen aus dem Cytosol menschlicher Erythrocyten dargestellt und gereinigt worden. Diese Sulfhydrylgruppen-abhängige Protease baut hochspezifisch Insulin in physiologischen Konzentrationen ab. Ein ähnliches Enzym konnten Neal aus dem menschlichen Skelettmuskel isolieren. Die Insulinaseaktivität wurde im Erythrocytenhämolysat bestimmt. Gemessen wurde die Radioaktivität der Insulinbruchstücke im trichloressigsäurelöslichen Überstand. Diese Aktivität zeigte während des gesamten Testablaufes (25 Minuten) eine streng lineare Zunahme. Die hieraus errechnete Enzymaktivität wurde auf Hämoglobin bezogen, woraus sich die spezifische Insulinaseaktivität ergab (mU/mg Hb).

Die spezifische prozentuale Bindung von ¹²⁵J-Insulin an die Erythrocytenmembran wurde nach Gambhir et al. bestimmt.

Die Insulinaseaktivität war bei allen oral eingestellten Diabetikern gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$ bei gut und $p < 0,04$ bei schlecht eingestellten). Die Qualität der Stoffwechselsituation spielte dabei kaum eine Rolle. Bei den Sekundärversagern führte aber die Umstellung auf Insulin zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,01$) der Insulinaseaktivität, die dann etwa im Bereich der Kontrollgruppe lag. Die Gruppe der besonders Insulinresistenten erreichte das höchste Niveau ($p < 0,02$ gegenüber der Kontrollgruppe).

Bei der maximalen spezifischen Insulinbindung zeigten die oral gut eingestellten Diabetiker die höchsten Werte, die Sekundärversager die niedrigsten. Der Unterschied war signifikant ($p < 0,02$). Der Bereich der Kontrollgruppe lag etwa in der Mitte. Hier führte die Insulintherapie der Sekundärversager zu einer signifikanten Anhebung ($p < 0,04$) der Bindungswerte wiederum auf das Niveau der Kontrollgruppe. In diesem Bereich lag auch die Gruppe der Insulinresistenten. Anhand der Scatchard-Analysen wurden die R_0 -Werte ermittelt, ein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen. Dabei zeigten alle insulinbehandelten Diabetiker deutlich erniedrigte R_0 -Werte gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den oral eingestellten Patienten fanden sich leicht erhöhte Werte.

Des weiteren ergaben sich auch Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Insulinaseaktivität und maximaler spezifischer Insulinbindung beziehungsweise Plasmainsulinspiegel. In der Kontrollgruppe war die Insulinaseaktivität sowohl mit der Insulinbindung ($r = 0,60$; $p < 0,05$) als auch mit dem Insulinspiegel ($r = 0,63$; $p < 0,05$) direkt korreliert. Bei den Typ 2 Diabetikern, besonders bei den Sekundärversagern fand sich eine negative Korrelation zwischen der Insulinaseaktivität und dem Plasmainsulinspiegel ($r = 0,76$; $p < 0,05$ vor Umstellung und $r = 0,87$; $p < 0,01$ nach Umstellung auf Insulin). Ein hoher Abbau war also mit einem niedrigen Insulinspiegel verbunden und umgekehrt.

Ein erhöhter Abbau von Insulin wird schon lange als mögliche Ursache einer verminderten Antwort des Stoffwechsels auf Insulin angesehen. Dennoch finden sich in der Literatur nur wenige konkrete Berichte, in denen ein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden konnte zwischen stark ausgeprägter Insulinresistenz und einem erhöhten Insulinabbau in Fett- oder Muskelgewebe.

Die vorliegende Untersuchung sollte mehr generell bei Typ 2 Diabetikern, die fast immer auch eine gewisse Insulinresistenz aufweisen, Aspekte der Insulindegradation studieren.

Zusammenfassend ergibt sich in Übereinstimmung mit verschiedenen Berichten in der Literatur der Eindruck, daß die Insulinaseaktivität ein regulierbarer Mechanismus ist, durch den der Insulinabbau in den Zielgeweben beeinflußt wird. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Insulinabbau und sowohl Insulinmangel als auch Insulinresistenz.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Langner J., Wiederanders, B., Hanson H (1973):
Metabolism of insulin and glucagon; glutathione-insulin transhydrogenase from microsomes of rat liver.
Eur. J. Biochem. 32, 27-35

- 2 Archer J.A., Gorden P., Roth J. (1975):
Defect in insulin binding to receptors in obese men - amelioration with calorie restriction.
J. Clin. Invest. 55, 166-174

- 3 Avruch J., Nemenoff R.A., Blackshear P.J., Pierce M.W., Osathanondh R. (1982):
Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in detergent extracts of human placental membranes.
J. Biol. Chem. 257, 15162-15166

- 4 Bachmann W., Sieger C., Lacher F., Lotz N. (1981):
Binding of biosynthetic human insulin to erythrocytes of normal and insulin-dependent diabetic subjects: comparison with pork and human pancreatic insulin.
Diabetes Care 4, 215-219

- 5 Beck-Nielsen H., Pedersen O. (1979):
Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes.
Diabetologia 17, 77-84

- 6 Beck-Nielsen H., Pedersen O., Lindskov H.O (1979):
Increased insulin sensitivity and cellular insulin binding in obese diabetics following treatment with glibenclamide.
Acta Endocrinol. 50, 451-462

- 7 Bellomo G., Bellazzi R., Nicotera P.L., Francesconi R., Fratino P. (1982):
Binding and degradation of ¹²⁵J-insulin in human erythrocytes. Comparative studies with hemolysate and membranes.
J. Endocrinol. Invest. 5, 287-291

- 8 Bergeron J.J.M., Levine G., Sikstrom R., Nadler N.J., Kopriwa B., Posner, B.I. (1977):
Localization of liver insulin receptors by radioautography.
J. Cell Biol. 75, 182 a (abstract)
- 9 Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stork H. (1974):
D-Glucose; Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.
In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., S. 1241, Verlag Chemie, Weinheim
- 10 Blazar B.R., Whitley C.B., Kitabchi A.E., Tsai M.Y., Santiago J., White N., Stentz F.B., Brown D.M. (1984):
In vivo chloroquine-induced inhibition of insulin degradation in a diabetic patient with severe insulin resistance.
Diabetes 33, 1133-1137
- 11 Bolinder J., Östman J., Arner P. (1982):
Postreceptor defects causing insulin resistance in normoinsulinemic non-insulin-dependent diabetes mellitus.
Diabetes 31, 911-916
- 12 Boyum A. (1968):
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Invest. 21 (Suppl. 97), 77-89
- 13 Brush J.S., Kitabchi A.E. (1970):
Metabolic disposition of ^{131}J -iodoinsulin within the rat diaphragm.
Biochem. Biophys. Acta 215, 134-144
- 14 Brush J.S., Memphis Ph.D. (1971):
Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat muscle.
Diabetes 20, 151-155
- 15 Brush J.S., Nascimento C.G. (1982):
Studies of the properties of the insulin protease of rat liver.
Biochem. Biophys. Acta 704, 398-402

- 16 Burghen G.A., Kitabchi A.E., Brush J.S. (1972):
Characterization of a rat liver protease with specificity for insulin.
Endocrinology 91, 633-642
- 17 Carpentier J.-L., Gorden P., Freychet P., LeCam A., Orci L. (1979):
Lysosomal association of internalized ^{125}J -insulin in isolated rat hepatocytes.
J. Clin. Invest. 63, 1249-1261
- 18 DePirro R., Fusco A., Lauro R., Testa I., Ferreti F., DeMartinis C. (1980):
Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus.
Diabetes 29, 96-99
- 19 Dons R.F., Corash L.M., Gorden P. (1981):
The insulin receptor is an age-dependent integral component of the human erythrocyte membrane.
J. Biol. Chem. 256, 2982-2987
- 20 Dons R.F., Ryan J., Gorden P., Wachslight-Rodbard H., (1981):
Erythrocyte and monocyte insulin binding in man, a comparative analysis in normal and disease states.
Diabetes 30, 896-902
- 21 Duckworth W.C., Gifford D., Kitabchi A.E., Runyan K., Solomon, S.S. (1979):
Insulin binding and degradation by muscles from streptozotocin-diabetic rats.
Diabetes 28, 746-748
- 22 Duckworth W.C., Heinemann M.A., Kitabchi A.E. (1972):
Purification of insulin-specific protease by affinity chromatography.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3698-3702

- 23 Duckworth W.C., Kitabchi A.E. (1981):
Insulin metabolism and degradation.
Endocr. Rev. 2, 210-233
- 24 Duckworth W.C., Kitabchi A.E. (1974):
Insulin and glucagon degradation by the same enzyme.
Diabetes 23, 536-543
- 25 Eaton R.P., Galagan R., Kaufman E., Allen R.C., Russel L.,
Miller F. (1981):
Receptor depletion in diabetes mellitus: correction with
therapy.
Diabetes Care 4, 299-304
- 26 Eng J., Lee L., Yalow R.S. (1980):
Influence of age of erythrocytes on their insulin receptors.
Diabetes 29, 164-166
- 27 Fehlmann M., Carpentier, J.-L., LeCam A., Thamm P., Saunders
D., Brandenburg D., Orci L., Freychet P. (1982): Biochemical
and morphological evidence that the insulin receptor is inter-
nalized with insulin in hepatocytes.
J. Cell Biol. 93, 82-87
- 28 Flier J.S., Minaker K.L., Landsberg L., Young J.B., Pallotta,
J., Rowe J.W. (1982):
Impaired in vivo insulin clearance in patients with severe
target-cell resistance to insulin.
Diabetes 31, 132-135
- 29 Funcke H.J., Kolb H.J., Standl E. (1975):
Rate of insulin degradation in different organs of diabetic
rodents.
Diabetologia 11, 382 (abstract)
- 30 Gambhir K.K., Archer J.A., Bradley C.J. (1978):
Characteristics of human erythrocyte insulin receptors.
Diabetes 27, 701-708

- 31 Gambhir K.K., Archer J.A., Carter L. (1977):
Insulin radioreceptor assay for human erythrocytes.
Clin. Chem. 23, 1590-1595
- 32 Gavin J.R., Roth, J., Jen P., Freychet P. (1972):
Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 747-751
- 33 Gebrauchsinformation Ficoll-Paque
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- 34 Gebrauchsinformation Hämoglobin Merckotest^R
E. Merck Diagnostica, Darmstadt
- 35 Gebrauchsinformation RIA-gnost^R Insulin (1981)
Behringwerke AG, Marburg
- 36 Gliemann, J., Sonne O. (1978):
Binding and receptor-mediated degradation of insulin in
adipocytes.
J. Biol. Chem. 253, 7857-7863
- 37 Gliemann J., Sonne O. (1977):
The mechanism of action of polypeptide hormones with spe-
cial reference to insulin's action on glucose transport.
Clin. Endocrinol. (Oxf.) 7, 405-415
- 38 Gorden P., Carpentier J.-L., Moule, M.L., Yip C.C., Orci L.
(1982):
Direct demonstration of insulin receptor internalization, a
quantitative electron microscopic study of covalently bound
¹²⁵I-photoreactive insulin incubated with isolated hepato-
cytes.
Diabetes 31, 659-662
- 39 Gries F.A., Berchtold P., Berger M. (1976):
Adipositas, Pathophysiologie, Klinik, Therapie.
Springer, Berlin

- 40 Grigorescu F., Flier J.S., Kahn C.R. (1984):
A defect in receptor phosphorylation in erythrocytes and fibroblasts associated with severe insulin resistance.
J. Biol. Chem. 259, 15003-15006
- 41 Grigorescu F., White M.F., Kahn C.R. (1983):
Insulin binding and insulin-dependent phosphorylation of the insulin receptor solubilized from human erythrocytes.
J. Biol. Chem. 258, 13708-13716
- 42 Grunberger G., Zick Y., Gorden P. (1984):
Defect in phosphorylation of insulin receptors in cells from an insulin-resistant patient with normal insulin binding.
Science 223, 932-934
- 43 Harmon J.T., Kempner E.J., Kahn C.R. (1981):
Demonstration by radiation inactivation that insulin alters the structure of the insulin receptor in rat liver membranes.
J. Biol. Chem. 256, 7719-7722
- 44 Heding L.G. (1972):
Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients.
Diabetologia 8, 260-266
- 45 Kahn C.R. (1982):
Insulin receptors and syndromes of insulin resistance.
Diabetes Care 5 (Suppl. 1), 98-101
- 46 Kahn C.R., Baird K.L. (1977):
The fate of insulin bound to adipocytes: evidence for compartmentalization and processing.
Diabetes 26, 354 (abstract)
- 47 Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D.L., Kahn C.R. (1983):
Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2137-2141

- 48 Kasuga M., Hedo J.A., Yamada K.M., Kahn C.R. (1982):
The structure of the insulin receptor and its subunits:
Evidence for multiple non-reduced forms and a 210 K possible
proreceptor.
J. Biol. Chem. 257, 10392-10399
- 49 Kasuga M., Karlsson F.A., Kahn C.R. (1982):
Insulin stimulates the phosphorylation of the 95 000-Dalton
subunit of its own receptor.
Science 215, 185-187
- 50 Kitabchi A.E., Stentz F.B. (1972):
Degradation of insulin and proinsulin by various organ homo-
genates of rat.
Diabetes 21, 1091-1101
- 51 Kitabchi A.E., Stentz F.B., Cole C., Duckworth W.C. (1979):
Accelerated insulin degradation: an alternate mechanism for
insulin resistance.
Diabetes Care 2, 414-417
- 52 Kolb H.J., Standl E. (1980):
Purification to homogeneity of an insulin-degrading enzyme
from human erythrocytes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1029-1039
- 53 Kolb H.J., Standl E. (1980):
An insulin-degrading enzyme from human erythrocytes: isola-
tion and characterization.
Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp 501-508
- 54 Kolterman O.G., Gray R.S., Griffin J., Burstein P., Insel, J.,
Scarlett J.A., Olefsky J.M. (1981):
Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin
resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus.
J. Clin. Invest. 68, 957-969

- 55 Kosmakos F.C., Nagulesparan M., Bennett P.H. (1980):
Insulin binding to erythrocytes: a negative correlation with red cell age.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 46-50
- 56 Lang U., Kahn R., Chrambach A. (1980):
Characterization of the insulin receptor and insulin-degrading activity from human lymphocytes by quantitative polyacrylamide gel electrophoresis.
Endocrinology 106, 40-49
- 57 Luft R., Wajngot A., Efendic S. (1981):
On the pathogenesis of maturity-onset diabetes.
Diabetes Care 4, 58-63
- 58 Maberly G.F., Wait G.A., Kilpatrick J.A., Loten E.G., Gain K.R., Stewart R.D.H., Eastman C.J. (1982):
Evidence for insulin degradation by muscle and fat tissue in an insulin resistant diabetic patient.
Diabetologia 23, 333-336
- 59 Marshall S., Olefsky J.O. (1981):
Characterization of insulin-induced receptor loss and evidence for internalization of the insulin receptor.
Diabetes 30, 746-753
- 60 McElduff A., Eastman C.J., Haynes S.P., Bowen K.M. (1980):
Apparent insulin resistance due to abnormal enzymatic insulin degradation: a new mechanism for insulin resistance.
Aust. NZJ Med. 10, 56-61
- 61 Mirsky I.A. (1964):
The metabolism of insulin.
Diabetes 13, 225-234
- 62 Misbin R.I., Almira E.C., Cleman M.W. (1981):
Insulin degradation in serum of a patient with apparent insulin resistance.
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 52, 177-180

- 63 Misbin R.I., Davies J.G., Offord R.E., Halban P.A., Mehl, T.D. (1980):
Binding and degradation of semisynthetic tritiated insulin by IM-9 cultured human lymphocytes.
Diabetes 29, 730-735
- 64 Müller W.A., Taillers C., Lereret S., Berger M., Philippe J., Halban P.A., Offord R.E. (1980):
Resistance against subcutaneous insulin successfully managed with aprotinin.
Lancet 1, 1245-1246
- 65 Nakagawa S., Nakayama H., Sasaki T., Yoshino K., Yu Y.Y., Shinozaki K., Aoki S., Mashimo K. (1973):
A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients.
Diabetes 22, 590-600
- 66 Neal G.W., Kitabchi A.E. (1982):
Insulin degradation by human skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Acta 719, 259-266
- 67 Nosadini R., Del Prato S., Tiengo A., Duner E., Toffolo G., Cobelli C., Faronato P.P., Moghetti P., Muggeo M. (1982):
Insulin sensitivity, binding and kinetics in pancreatogenic and type 1 diabetes.
Diabetes 31, 346-355
- 68 Olefsky J.M. (1981):
Insulin resistance and insulin action: an in vitro and in vivo perspective.
Diabetes 30, 148-162
- 69 Olefsky J.M., Reaven G.M. (1976):
Effects of sulfonylurea therapy on insulin binding to mononuclear leukocytes of diabetic patients.
Am. J. Med. 60, 89-95

- 70 Paulsen E.P., Courtney J.W., Duckworth W.C. (1979):
Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin.
Diabetes 28, 640-645
- 71 Pedersen O., Hjøllund E., Beck-Nielsen H., Lindskov H.O., Sonne O., Gliemann J. (1981):
Insulin receptor binding and receptor-mediated insulin degradation in human adipocytes.
Diabetologia 20, 636-641
- 72 Pfeifer M.A., Halter J.B., Porte D. (1981):
Insulin secretion in diabetes mellitus.
Am. J. Med. 70, 579-588
- 73 Philippe J., Halban P.A., Gjinovci A., Duckworth W.C., Estreicher J., Renold A.E. (1981):
Increased clearance and degradation of (³H) insulin in streptozotocin diabetic rats. Role of the insulin-receptor compartment.
J. Clin. Invest. 67, 673-680
- 74 Poole G.P., Connor K.J.O., Lazarus N.R., Pogson C.I. (1982):
¹²⁵I-labelled insulin degradation by isolated rat hepatocytes: The roles of glutathione-insulin transhydrogenase and insulin-specific protease.
Diabetologia 23, 49-53
- 75 Powers A.C., Solomon S.S., Duckworth W.C. (1980):
Insulin degradation by mononuclear cells.
Diabetes 29, 27-32
- 76 Reaven G.M., Bernstein R., Davis B., Olefsky J.M. (1976):
Non-ketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance?
Am. J. Med. 60, 80-88
- 77 Röschlau P., Bernt E., Gruber W. (1974):
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 12, 403

- 78 Roth J. (1981):
Insulin binding to its receptor: is the receptor more important than the hormone?
Diabetes Care 4, 27-32
- 79 Runyan K., Duckworth W.C., Kitabchi A.E., Huff G. (1979):
The effect of age on insulin-degrading activity in rat tissue.
Diabetes 28, 324-325
- 80 Scarlett J.A., Gray R.S., Griffin J., Olefsky J.M., Kolterman O.G. (1982):
Insulin treatment reverses the insulin resistance of type 2 diabetes mellitus.
Diabetes Care 5, 353-363
- 81 Scatchard G. (1949):
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-675
- 82 Schlessinger J., VanObberghen E., Kahn C.R. (1980):
Insulin and antibodies against the insulin receptor cap on the membrane of cultured lymphocytes.
Nature 286, 729-731
- 83 Schneider H. (1982):
Messungen einer spezifischen Insulinaseaktivität in Erythrocyten von Normalpersonen und Diabetikern.
Inaugural-Dissertation, LMU München
- 84 Schnek A.G., Schroeder W.A. (1961):
The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis.
J. Amer. Chem. Soc. 83, 1472-1478

- 85 Schwartz R.H., Bianco A.R., Handwerger B.S., Kahn C.R. (1975):
Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 474-478
- 86 Seals J.R., Czech M.P. (1981):
Characterization of a pyruvate dehydrogenase activator released by adipocyte plasma membranes in response to insulin.
J. Biol. Chem. 256, 6529-6535
- 87 Seals J.R., Jarett L. (1980):
Activation of pyruvate dehydrogenase by direct addition of insulin to an isolated plasma membrane/mitochondrial mixture: Evidence for generation of insulin's second messenger in a subcellular system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 77-81
- 88 Shia M.A., Pilch P.F. (1983):
The beta-subunit of the insulin receptor is an insulin activated protein kinase.
Biochemistry 22, 717-721
- 89 Skyler J.S. (1982):
Type 2 diabetes: Toward improved understanding and rational therapy.
Diabetes Care 5, 447-450
- 90 Soman V.R., DeFronzo R.A. (1980):
Direct evidence for downregulation of insulin receptors by physiologic hyperinsulinemia in man.
Diabetes 29, 159-163
- 91 Soman V.R., Koivisto V.A., Deibert D., Felig P., DeFronzo, R.A. (1979):
Increased insulin sensitivity and insulin binding to monocytes after physical training.
N. Engl. J. Med. 301, 1200-1204

- 92 Terris S., Steiner D.F. (1975):
Binding and degradation of ^{125}J -insulin by rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 250, 8389-8398
- 93 Terris S., Steiner D.F. (1976):
Retention and degradation of ^{125}J -insulin by perfused livers
from diabetic rats.
J. Clin. Invest. 57, 885-896
- 94 Thomopoulos P., Testa U., Flamier A., Berthelie M. (1980):
Insulin receptors and protein synthesis in bone marrow cells
and reticulocytes.
Diabetes 29, 820-824
- 95 Thomopoulos P., Berthelie M., Laudat M.H. (1978):
Loss of insulin receptors on maturation of reticulocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1460-1465
- 96 Tschesche H., Dietl T., Kolb H.J., Standl E. (1974):
An insulin degrading proteinase from human erythrocytes
and its inhibition by proteinase inhibitors.
In: Proteinase Inhibitors, S. 586-593, Springer 1974
- 97 Van Kampen E.J., Zijlstra W.G. (1961):
Clin. Chem. Acta 6, 538
- 98 Varandani P.T. (1972):
Insulin degradation. I. Purification and properties of glu-
tathione-insulin-transhydrogenase of rat liver.
Biochem. Biophys. Acta 286, 126-135
- 99 Wahlefeld A.W. (1974):
Triglyceride.
In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen
Analyse, 3. Aufl., Bd. II, S. 1878, Verlag Chemie, Weinheim

- 100 Walter P., von Specht B., Kolb H.J., Brandenburg D., Rapp, J., Brendel W. (1983):
Insulinspezifische Immunsuppression durch kovalent an Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP) gebundenes Insulin.
Allergologie 6, 272-276
- 101 Ward G.M., Rees A.R., Nylor B.A., Turner R.C. (1981):
The relationship of erythrocyte insulin receptors to the cell age and to monocytes insulin receptors.
Clin. Endocrin. 14, 269-278
- 102 White M.F., Häring H.-U., Kasuga M., Kahn C.R. (1984):
Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells.
J. Biol. Chem. 259, 255-264
- 103 Wisner M.H., Baron M.D., Jones R.H., Sonksen P.H., Saunders, D.J. et al (1980):
Photoreactive insulin analogues used to characterize the insulin receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 492-496
- 104 Yalow R.S., Berson S.A. (1960):
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin. Invest 39, 1157-1175
- 105 Yip C.C., Yeung C.W.T., Moule M.L. (1980):
Photoaffinity labeling of insulin receptor proteins of liver plasma membrane proteins.
Biochemistry 19, 70-76
- 106 Yokono K., Imamura Y., Shii K., Sakai H., Baba S. (1981):
Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from pig skeletal muscle.
Endocrinology 108, 1527-1532
- 107 Zweig S., Singer S.J. (1979):
J. Cell Biol. 80, 487-491

VIII LEBENSLAUF

Geboren: am 18. Februar 1958 in München, röm.katholisch getauft;

Vater: Dr. med. Rudolf Standl, praktischer Arzt, später Arzt
für Allgemeinmedizin in München; geboren: 22.01.1912

Mutter: Angelika Standl, geborene Geßner, geboren: 12.02.1915

~ September 1964 bis Juli 1968: Volksschule an der Weilerstraße in
München

~ September 1968 bis Juni 1977: Wilhelmsgymnasium in München
(Humanistisches Gymnasium), allgemeine Hochschulreife im Juni 1977

~ Juli 1977 bis April 1978: Wehrdienst bei der Bundesmarine,
Unterbrechung zum Studium der Medizin

~ 1. Mai 1978 bis 5. November 1984: Studium der Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

März 1980: Physikum

März 1981: 1. Staatsexamen

August 1983: 2. Staatsexamen

Oktober 1983 bis September 1984: Praktisches Jahr (1. Tertial
Chirurgie, Städt. Krankenhaus München-Schwabing, 2. Tertial
Dermatologie, Dermatologische Klinik und Poliklinik der Univer-
sität München, 3. Tertial Innere Medizin, Zentralklinikum
Augsburg)

Oktober 1984: 3. Staatsexamen

~ 5. November 1984: Approbation als Arzt

~ März 1985 bis Juni 1985: Ableistung des restlichen Grundwehr-
dienstes mit fachdienstlicher Verwendung als Stabsarzt

~ seit 1. Juli 1985: Assistenzarzt bei Professor Dr. med. H. Mehnert,
Chefarzt der III. Medizinischen Klinik des Städtischen Kranken-
hauses München-Schwabing und Leiter der Forschergruppe Diabetes

~ 4. Mai 1985: Eheschließung mit Fräulein Anna-Maria Wörle aus Weil-
heim in Oberbayern, Krankenschwester

